



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS IMPLICADOS EN LA
DISEMINACIÓN GANGLIONAR DE SÍNDROMES
LINFOPROLIFERATIVOS DE CÉLULAS B: PAPEL DE CCR7 EN
LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA-B**

TESIS DOCTORAL

Sonia López Giral

Madrid, 2007



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS IMPLICADOS EN LA
DISEMINACIÓN GANGLIONAR DE SÍNDROMES
LINFOPROLIFERATIVOS DE CÉLULAS B: PAPEL DE CCR7 EN
LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA-B**

Sonia López Giral
Licenciada en Biología

Directora de tesis: Dra. Cecilia Muñoz Calleja
Servicio de Inmunología
Hospital Universitario de La Princesa
Madrid

El trabajo presentado por Doña Sonia López Giral, “*Receptores de quimioquinas implicados en la diseminación ganglionar de Síndromes Linfoproliferativos de Células B: Papel de CCR7 en la Leucemia Linfática Crónica-B*”, ha sido realizado bajo mi dirección en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid.

La primera fase del trabajo consistió en el estudio del patrón de expresión de receptores de quimioquinas de diferentes leucemias y linfomas de células B. Los resultados, tanto de expresión, como funcionales, permitieron establecer una clara correlación entre la expresión del receptor de quimioquinas CCR7 y la diseminación ganglionar de diversas patologías y, en particular, de la Leucemia Linfática Crónica-B (LLC-B). En la fase final del proyecto, se esclarecieron las principales vías de señalización intracelulares que median la quimiotaxis de las células de LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7, demostrando un papel fundamental de la vía PI3K/Akt. Asimismo, se intentó establecer si dichas vías ejercían una función similar en linfocitos B normales. Para el desarrollo de estos proyectos, se requirió el uso de diversas técnicas experimentales.

Los resultados obtenidos aportan numerosos datos para esclarecer los factores implicados en el patrón diferencial de diseminación e infiltración de ganglios linfáticos de las diferentes leucemias y linfomas de células B. Por otra parte, este estudio ha permitido la identificación de CCR7 como una óptima diana para inmunoterapia, que se confirmó demostrando la capacidad de anticuerpos monoclonales frente a CCR7 para eliminar *in vitro* las células tumorales. Parte de los resultados obtenidos han sido comunicados en diversos congresos, tanto nacionales como internacionales, y han llevado a la obtención de manuscritos publicados o sometidos para su publicación.

Por estas razones, considero que puede procederse a la presentación y defensa de la memoria, lo que hago constar a los efectos oportunos.

Madrid, 13 de noviembre de 2007.

Dra. Cecilia Muñoz Calleja

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Antes de nada, quiero agradecerle a Cecilia todo su apoyo en este largo camino que hemos recorrido. Ya se ven muy lejanos aquellos primeros momentos en los que inauguramos el laboratorio y, con esfuerzo, comenzaban los primeros experimentos y tomaban forma las líneas de investigación a seguir. Y especialmente también, agradecer su ayuda y amistad a aquellas personas que han formado o forman parte todavía del laboratorio. A Mónica y a Nuria, que tantos marcajes de CCR7 hicieron. A Manu, que tanto me ha soportado, y a Carlos, que ha sido indispensable en esta última etapa. Por último, un agradecimiento muy especial a Ana Ramírez, por su ayuda y su amistad.

Quiero dar las gracias también de forma especial a aquellas personas que nos ayudaron a conseguir las muestras de sangre, a Valle y a Javier Loscertales del Servicio de Hematología, a Pilar Cañas y, cómo no, a Toñi, sin la cual creo que ni siquiera existiría la tesis. Recordar también las horas de citómetro compartidas con Mariano, y su ayuda para aprender a hacer inmunofenotipos.

Es difícil nombrar a todo el mundo al que tengo que dar las gracias. Durante todos estos años en el laboratorio, muchas personas me han ayudado en los experimentos, o con su amistad, o simplemente con su conversación colaborando a un ambiente de trabajo estupendo. Dar mis más sinceras gracias al Dr. Francisco Sánchez Madrid y a todo su grupo, por su inestimable ayuda, no sólo técnica para hacer los experimentos o por compartir reactivos, sino también por las ideas que nos han aportado (sin olvidar los buenos ratos pasados). Quiero recordar a Hortensia, Mónica Gordon, Manu, Manolo Gómez (gracias especiales por revisar la tesis), Mittel, Mercedes, Román, David Sancho, Mymo, Olga, Reyes, Ángeles Ursa, Miguel Vi, y sé que me olvido de alguien. Por las mismas razones, dar las gracias al Dr. Manuel Ortiz de Landázuri y a todo su grupo: Maika (por todo lo que me enseñó al principio), Fernando, Silvia, Julián, Alicia, Salva, Elisa, Mónica Feijoo, Rafa, Pilar, Ainara... Y no quiero olvidarme de dar las gracias a Luis del Peso, Marisa, Diego, M^a Ángeles Vallejo y a la gente de la novena como Mara, Pedro, M^a Ángeles, etc.

Quiero también agradecer su ayuda a los que económicamente permitieron que terminara este trabajo, a la Fundación de Investigación Biomédica del Hospital de la Princesa y a la Fundación LAIR. Y, asimismo, a la empresa de biotecnología *Immunological and Medicinal Products* y, en concreto, a Fernando Terrón, por su ayuda, no sólo en la financiación del proyecto, sino también científica.

Gracias enormes por su apoyo a mi hermana y a mis amigos, a pesar de que creo que nunca han entendido muy bien en qué trabajo, y en especial a Virginia, Cristina, y a Berta y Raquel, que me soportaron en casa mientras la escribía. Por último, mis gracias más sinceras a mis padres. En verdad, nunca podré agradecerles todo lo que han hecho por mí, la educación que me han dado, el cariño, la confianza y la libertad de elegir mi propio camino.

RESUMEN / SUMMARY

Las neoplasias de células B presentan patrones de diseminación e infiltración de los órganos linfoides muy heterogéneos entre sí, lo cual puede deberse a una expresión diferencial de receptores de quimioquinas. Demostramos que aquellas leucemias y linfomas B caracterizados por una amplia infiltración de ganglios linfáticos expresan altos niveles de los principales receptores implicados en la entrada de los linfocitos en órganos linfoides secundarios, CCR7, CXCR4 y CXCR5. En cambio, aquellas patologías que presentan mínima o nula infiltración ganglionar expresan nulos o bajos niveles de CCR7 y CXCR5, y bajos a moderados del receptor CXCR4. Además, los índices de migración de las células de leucemia linfática crónica-B (LLC-B) en respuesta a los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21, correlacionan con la presencia de linfadenopatía clínica en los pacientes. En consecuencia, estudiamos las principales vías de señalización inducidas por CCR7 implicadas en la migración de las células leucémicas. Las MAPKs no juegan ningún papel en la quimiotaxis de células LLC-B a pesar de la fuerte activación de ERK1/2 dependiente de proteínas Gi que se produce tras estimulación de CCR7. En cambio, las vías PI3K/Akt y ROCK regulan la quimiotaxis dependiente de CCR7 de las células LLC-B. Detectamos Akt constitutivamente fosforilado en dichas células, cuyo nivel aumenta tras estimulación con los ligandos de CCR7. Las vías de señalización que median la quimiotaxis de linfocitos B normales en respuesta a CCL19 son similares a las de las células LLC-B con la excepción de la vía PI3K/Akt, la cual no juega un papel significativo.

B cell neoplasms present heterogenous patterns of lymphoid organ involvement, which may be a result of the differential expression of chemokine receptors. We found that CCR7, CXCR4 and CXCR5, the main receptors mediating lymphocyte entry into secondary lymphoid tissues, were highly expressed in B malignancies with widespread involvement of lymph nodes. Conversely, those pathologies with little or no nodular dissemination showed no expression to very low levels of CCR7 and CXCR5 and low to moderate levels of CXCR4. Moreover, the migration index of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) cells in response to CCR7 ligands, CCL19 and CCL21, correlated with the presence of clinical lymphadenopathy. In consequence, we studied the main signaling pathways involved in CCR7-mediated migration of leukemic cells. MAPKs were not involved in CLL migration nevertheless the strong Gi-dependent ERK1/2 activation after triggering CCR7. Conversely, PI3K/Akt and ROCK regulated the CCR7-dependent chemotaxis of CLL cells. We detected constitutively phosphorylated Akt in CLL cells, which increased after stimulation with CCR7 ligands. The signaling pathways that mediated chemotaxis of normal B lymphocytes in response to CCL19 resembled those used by CLL cells with the exception of PI3K/Akt, which did not play a significant role.

ÍNDICE

1 - INTRODUCCIÓN

1. Quimioquinas.....	15
1.1. Nomenclatura y clasificación.....	15
1.2. Receptores de quimioquinas.....	17
2. Señalización de los receptores de quimioquinas.....	18
2.1. Introducción.....	18
2.2. Familia de las MAPKs.....	19
2.3. Familia de pequeñas GTPasas Rho.....	20
2.4. Familia de fosfatidilinositol-3'-OH quinasas (PI3K).....	21
3. Órganos linfoides.....	22
3.1. Estructura de los ganglios linfáticos.....	23
4. Quimioquinas y tráfico leucocitario.....	24
4.1. <i>Homing</i> linfocitario a órganos linfoides secundarios.....	24
4.2. Interacción T/B en el interior de los tejidos linfoides.....	26
4.3. CCR7 y sus ligandos: CCL19 y CCL21.....	28
4.4. Señalización intracelular inducida por CCR7.....	29
5. Receptores de quimioquinas y metástasis.....	29
5.1. Cáncer y metástasis.....	29
5.2. Las quimioquinas y su papel en las metástasis.....	30
6. Linfomas no Hodgkin de células B (LNH-B).....	30
6.1. Leucemia linfática crónica de células B.....	32
6.2. Factores pronósticos de la LLC-B.....	33

2 – OBJETIVOS.....35

3 - MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes y células.....	38
2. Citometría de flujo.....	39
3. Quimioquinas, anticuerpos e inhibidores.....	39
4. Ensayo de quimiotaxis in vitro.....	40
5. Ensayo de polimerización de actina.....	41
6. Ensayo de internalización del receptor.....	41
7. Estudio del estado mutacional de los genes IgV_H.....	41

8. Ensayo de Western Blot.....	42
9. Nucleofecciones.....	43
10. Análisis estadístico.....	43

4 - RESULTADOS

1. Estudiar los patrones de expresión de receptores de quimioquinas de neoplasias de células B para profundizar en el conocimiento de sus patrones de migración y metastatización.....	46
1.1. La LLC-B y los LNH-B caracterizados por una amplia diseminación ganglionar expresan altos niveles de los receptores de las principales quimioquinas homeostáticas: CCR7, CXCR4 y CXCR5.....	46
2. Estudiar si el patrón de expresión de receptores de quimioquinas de una neoplasia B es similar al de su equivalente celular normal o es el resultado de una transformación neoplásica.....	50
2.1. El patrón de expresión de receptores de quimioquinas de una neoplasia B refleja el de su célula normal de origen.....	50
3. Caracterización funcional del receptor de quimioquinas CCR7.....	52
3.1. El patrón de quimiotaxis de diferentes poblaciones de células B está relacionado con los niveles de expresión de receptores de quimioquinas.....	52
3.2. La estimulación de CCR7 induce la polimerización de actina en células LLC-B.....	55
3.3. CCL19, pero no CCL21, induce la internalización de CCR7 en células de LLC-B.....	56
4. Estudiar una posible correlación de la quimiotaxis y la expresión de CCR7 en células de LLC-B con la presencia de linfadenopatías y otros factores pronósticos.....	57
4.1. La capacidad de las células LLC-B para migrar en respuesta a los ligandos de CCR7 correlaciona con la presencia de linfadenopatía clínica en los pacientes.....	57
4.2. Ni la capacidad quimiotáctica, ni la expresión de superficie de CCR7 de células de LLC-B correlaciona con diversos factores pronósticos.....	59
5. Caracterización de las principales vías de señalización implicadas en la quimiotaxis mediada por CCR7 de células de LLC-B.....	60
5.1. CCL19 y CCL21 inducen una fuerte activación de ERK1/2 en células de LLC-B dependiente de la señalización a través de proteínas Gi.....	60
5.2. CCL19 y CCL21 ejercen un efecto variable en la activación constitutiva de p38SAPK y JNK en células de LLC-B.....	63
5.3. Jerarquía de activación de las MAPKs en células de LLC-B.....	65

5.4. La quimiotaxis de células de LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7 no está mediada por la activación de la cascada de las MAPKs.....	69
5.5. PI3K y ROCK regulan la quimiotaxis dependiente de CCR7 de células LLC-B.....	71
5.6. ROCK, pero no PI3K, regula la quimiotaxis dependiente de CCR7 de células B normales de sangre periférica.....	76

5 - DISCUSIÓN

1. Estudio del patrón de expresión de receptores de quimioquinas en diferentes neoplasias de células B.....	79
▪ La LLC-B y los linfomas no Hodgkin caracterizados por una amplia diseminación ganglionar de las células neoplásicas expresan altos niveles de CCR7, CXCR4 y CXCR5.....	79
▪ El patrón de expresión de receptores de quimioquinas en las neoplasias hematológicas de células B refleja el de sus supuestos equivalentes celulares normales.....	81
▪ La mayor respuesta quimiotáctica <i>in vitro</i> de las células LLC-B en respuesta a CCL19 y CCL21 correlaciona con la presencia de linfadenopatía clínica en los pacientes.....	82
▪ CCL19, pero no CCL21, induce la internalización del receptor.....	84
2. Caracterización de las vías de señalización implicadas en la respuesta quimiotáctica de células LLC-B a los ligandos de CCR7.....	85
▪ La actividad de la cascada de las MAPKs no es necesaria para la quimiotaxis de células LLC-B en respuesta a CCL19 y CCL21.....	86
▪ La actividad PI3K regula parcialmente la quimiotaxis <i>in vitro</i> de células LLC-B, pero no de células B normales, mediada por CCR7.....	89
▪ La migración de células LLC-B en respuesta a CCL19 y CCL21 está regulada por ROCK.....	92
6 – CONCLUSIONES.....	95
7 – BIBLIOGRAFÍA.....	98
8 – ANEXO.....	115

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo.

Ag: Antígeno.

APC: Célula presentadora del antígeno (del inglés “*antigen-presenting cell*”).

BCR: Receptor de células B (del inglés “*B-cell receptor*”).

CG: Centro germinal.

CKR: Receptor de quimioquina (del inglés “*chemokine receptor*”).

CMF: Citometría de flujo.

Cys: Cisteína.

DAG: Diacilglicerol.

DC: Célula dendrítica (del inglés “*dendritic cell*”).

DOCK2: Del inglés “*dedicator of cytokinesis 2*”.

ERK: Del inglés “*extracellular-regulated kinase*”.

FL: Linfoma folicular (del inglés “*follicular lymphoma*”).

GAP: Proteínas activadoras de GTPasas (del inglés “*GTPase-activating proteins*”).

GEF: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina (del inglés “*guanine nucleotide exchange factor*”).

GFP: Proteína verde fluorescente (del inglés “*green fluorescent protein*”).

GL: Ganglio linfático.

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G (del inglés “*G-protein coupled receptors*”).

HCL: Tricoleucemia (del inglés “*hairy cell leukemia*”).

HEV: Vénulas especializadas de endotelio alto (del inglés “*high endothelial venules*”).

Ig: Inmunoglobulina.

IgV_H: Región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

JNK: Del inglés “*c-Jun N-terminal kinase*”.

LAL-B: Leucemia aguda linfoblástica de células B.

LB: Linfocito B.

LLC-B CD5⁺: Leucemia linfática crónica típica de células B CD5⁺.

LLC-B CD5⁻: Leucemia linfática crónica atípica de células B CD5⁻.

LNH-B: Linfoma no Hodgkin de células B.

LPL: Linfoma linfoplasmacítico (del inglés “*lymphoplasmacytic lymphoma*”).

LT: Linfocito T.

MALT: Tejidos linfoides asociados a mucosas (del inglés “*mucosa-associated lymphoid tissue*”).

MAPKs: Proteína quinasas activadas por mitógenos (del inglés “*mitogen-activated protein kinases*”).

MCL: Linfoma del manto (del inglés “*mantle lymphoma*”).

MEK: MAPK/ERK quinasa (del inglés “*MAPK/ERK kinase*”).

MIF: Media de intensidad de fluorescencia.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés “*major histocompatibility complex*”).

MKKs: Quinasas de las MAPKs (del inglés “*MAP kinase kinase*”).

MM: Mieloma múltiple.

MO: Médula ósea.

MZL: Linfoma de la zona marginal (del inglés “*marginal zone lymphoma*”).

OLS: Órganos linfoides secundarios.

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (del inglés “*peripheral blood mononuclear cells*”).

PDK: Proteína quinasa dependiente de PIP3 (del inglés “*PIP3-dependent protein kinase*”).

PE: Ficoeritrina (del inglés “*phycoerithrin*”).

PI3K: Fosfatidilinositol-3-OH-quinasa (del inglés “*phosphatidylinositol-3-OH-kinase*”).

PIP3: Fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (del inglés “*phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate*”).

PKB: Proteína quinasa B (del inglés “*protein kinase B*”).

PKC: Proteína quinasa C (del inglés “*protein kinase C*”).

PLC: Fosfolipasa C (del inglés “*phospholipase C*”).

PP: Placas de Peyer.

PPBL: Linfocitosis policlonal persistente de células B (del inglés “*persistent polyclonal B lymphocytosis*”).

PTX: Toxina pertúsica (del inglés “*pertussis toxin*”).

ROCK: Quinasa asociada a Rho (del inglés “*Rho-associated kinase*” o “*Rho coiled-coil associated kinase*”).

SAPK: Proteína quinasas activadas por estrés (del inglés *stress-activated protein kinase*).

SLP-B: Síndromes linfoproliferativos de células B.

SMZL: Linfoma esplénico de la zona marginal (del inglés “*splenic marginal zone lymphoma*”).

SP: Sangre periférica.

1-INTRODUCCIÓN

1. QUIMIOQUINAS

Las **quimioquinas** son una superfamilia de proteínas básicas de bajo peso molecular (8 a 15 kDa) que ejercen sus efectos mediante la unión a receptores de membrana en las células diana. Se definen por la presencia de cuatro cisteínas (Cys) en posiciones altamente conservadas. La mayoría son proteínas secretadas, sólo dos quimioquinas, CXCL16 y CX3CL1, realizan su función unidas a la membrana celular (Allen *et al.*, 2007). Originalmente, se descubrieron por su capacidad para reclutar diversos tipos celulares a los sitios de inflamación (Rollins, 1997; Baggiolini, 1998). Pero pronto quedó claro que estas moléculas juegan papeles mucho más amplios en la homeostasis inmune, siendo fundamentales para la maduración, recirculación y activación leucocitarias (Müller *et al.*, 2002; Moser *et al.*, 2004). Y debido a su claro papel en diversas enfermedades (Figura 1), han adquirido un gran potencial como posibles dianas terapéuticas (Gerard y Rollins, 2001; Proudfoot, 2002; Zlotnik, 2004; Laurence, 2005).

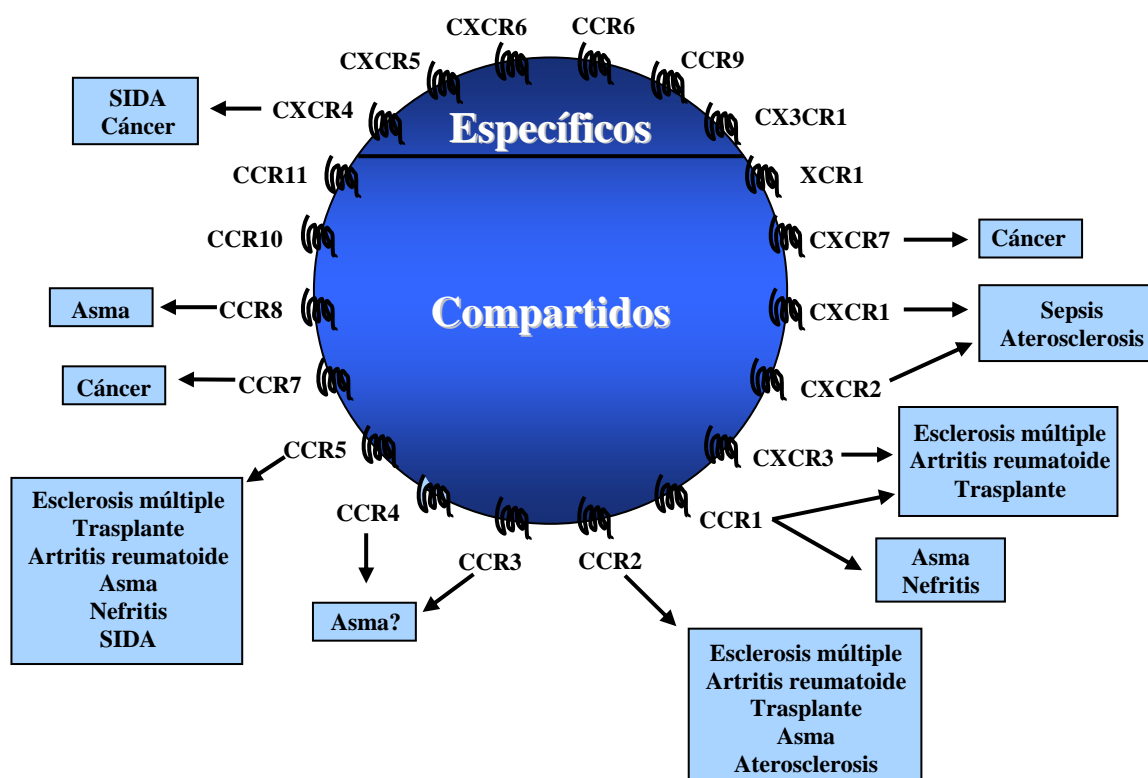


Figura 1. La expresión de receptores de quimioquinas se relaciona con múltiples enfermedades. Adaptada de Proudfoot, *Nat Rev Immunol* 2002. Se clasifican en “específicos” y “compartidos” en función de si se unen a un único ligando o a varios, respectivamente.

1.1. NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN

En la actualidad se conocen, aproximadamente, más de 50 quimioquinas diferentes, que se unen a, al menos, 20 receptores, la mayoría de los cuáles muestran promiscuidad para dos o más quimioquinas (Tabla 1). Se dividen en cuatro subfamilias en función de la posición de los dos residuos de Cys N-terminales de los polipéptidos (Allen *et al.*, 2007).

Se distinguen dos subfamilias estructurales principales, en las cuales los dos residuos de Cys N-terminales se pueden encontrar adyacentes (**familia CC**) o separados por un único aminoácido (**familia CXC**), y dos subfamilias adicionales, **C** y **CX3C**. La linfotactina- α /XCL1 y - β /XCL2 son quimioquinas C que comparten homología en su extremo carboxilo con las quimioquinas CC, pero pierden la primera y la tercera de las Cys. Fractalkina/CX3CL1, el único miembro de la clase CX3C descrito, tiene tres aminoácidos entre los dos primeros residuos de Cys.

Tabla 1. Clasificación de los receptores de quimioquinas humanos en subfamilias			
RECEPTOR	LIGANDO	RECEPTOR	LIGANDO
Familia de receptores CXC		Familia de receptores CC	
CXCR1	CXCL1, CXCL6, CXCL8	CCR1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL14-16, CCL23
CXCR2	CXCL1-3, CXCL5-8	CCR2	CCL2, CCL7, CCL12-13, CCL16
CXCR3	CXCL9-11	CCR3	CCL5, CCL7-8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26, CCL28
CXCR4	CXCL12	CCR4	CCL17, CCL22
CXCR5	CXCL13	CCR5	CCL3-5, CCL8, CCL14
CXCR6	CXCL16	CCR6	CCL20
CXCR7	CXCL11-12	CCR7	CCL19, CCL21
Familia de receptores CX3C		CCR8	CCL1, CCL4, CCL17
CX3CR1	CX3CL1	CCR9	CCL25
Familia de receptores C		CCR10	CCL27-28
XCR1	XCL1-2		

En la literatura, se utilizan dos **sistemas de nomenclatura** para las quimioquinas: los nombres y abreviaturas tradicionales que se pusieron en su descubrimiento, y una nomenclatura sistemática que combina motivos estructurales (CXC, CC, XC y CX3C) con “L” (de ligando), y el número de su gen respectivo (<http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp>) (Zlotnik y Yoshie, 2000; Nomenclature, 2003). Los receptores de quimioquinas (CKR, del inglés “chemokine receptor”) se designan de acuerdo al tipo de quimioquina que unen (CXC, CC, XC, y CX3C), seguido de “R” (de receptor) y un número indicando su orden de descubrimiento (Tabla 1).

Además, tradicionalmente se han dividido en dos grupos de acuerdo a su función y a la regulación de su expresión (Moser *et al.*, 2004): **inflamatorias o inducibles**, las cuales controlan el reclutamiento de los leucocitos efectores en infección, inflamación, daño tisular y tumores, y **homeostáticas**, cuya expresión se considera constitutiva dentro de órganos linfoides o no linfoides como la piel o mucosas. Dirigen el movimiento leucocitario durante la hematopoyesis en la médula ósea (MO) y el timo. Además, son fundamentales para el tráfico homeostático y la correcta distribución de los linfocitos y las células dendríticas (DCs, del inglés “dendritic cells”), tanto dentro de los órganos linfoides secundarios (OLS), como en tejidos periféricos para el correcto desarrollo de las respuestas inmunes (Cyster, 2005) (Tabla 2).

Tabla 2. Principales quimioquinas homeostáticas

QUIMIOQUINA	RECEPTOR	PRINCIPAL FUNCIÓN
CXCL12 (SDF-1)	CXCR4	Hematopoyesis. Recirculación linfocitaria y retención de células B en MO. Acumulación de células plasmáticas en MO y bazo.
CXCL13 (BCA-1; BLC)	CXCR5	Distribución de los linfocitos B en folículos. Respuesta de células B.
CCL19 (ELC; MIP-3 β) CCL21 (SLC; 6Ckine)	CCR7	Linfopoyesis T. Recirculación linfocitaria. Distribución de los leucocitos en los órganos linfoides secundarios.
CXCL14 (BRAK)	Desconocido	Desarrollo de células presentadoras del antígeno (APC).
CCL18 (DC-CK1)	Desconocido	Interacción de células T y DCs (bazo, ganglios linfáticos).

1.2. RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas ejercen sus efectos mediante la unión a una gran familia de receptores de superficie con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR, del inglés “*G-protein coupled receptors*”) que median señales de factores autocrinos y paracrinis (**Pierce *et al.*, 2002**) (**Figura 2**). Se expresan principalmente en leucocitos, aunque muchos otros tipos celulares pueden presentar CKR, como células endoteliales, estromales, epiteliales, de músculo liso y neuronas.

Los CKR tienen aproximadamente 350 aminoácidos de longitud (**Ono *et al.*, 2003**). Poseen un corto extremo N-terminal extracelular y un corto dominio C-terminal intracelular. La cola intracitoplasmática contiene residuos de serina y treonina conservados que se fosforilan por unión al ligando. Los siete dominios transmembrana son α -hélices, con tres lazos intracelulares y tres extracelulares entre los dominios transmembrana. Un puente disulfuro entre los lazos extracelulares 1 y 2 confiere rigidez al receptor dentro de la bicapa lipídica. De forma característica, poseen la secuencia de aminoácidos DRYLAIV en la segunda hélice intracelular, muy conservada y crítica para la activación del receptor.

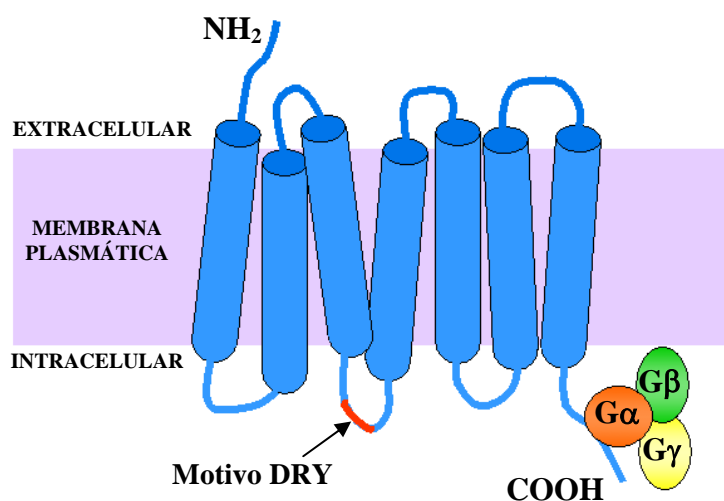


Figura 2. Esquema de la estructura genérica de un receptor de quimioquinas.

2. SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS

2.1. INTRODUCCIÓN

Las **proteínas G** consisten en tres subunidades, α , β y γ , de las que se conocen, al menos, 20, 6 y 12, respectivamente (Neves *et al.*, 2002; Cabrera-Vera *et al.*, 2003). La subunidad α contiene un dominio GTPasa implicado en la unión e hidrólisis del GTP. Clásicamente, las proteínas G se han dividido en 4 familias principales basándose en la similitud de sus subunidades α : $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$. La inhibición de la señalización de los CKR con toxina pertúsica (PTX, del inglés “*pertussis toxin*”) sugiere que las proteínas G_i son claves para la transmisión de señales de dichos receptores, aunque hay evidencias de que otras proteínas G resistentes a PTX, como G_q o G_{16} , podrían también asociarse a determinados CKR (Yang *et al.*, 2001; Rosenkilde *et al.*, 2004; Molon *et al.*, 2005).

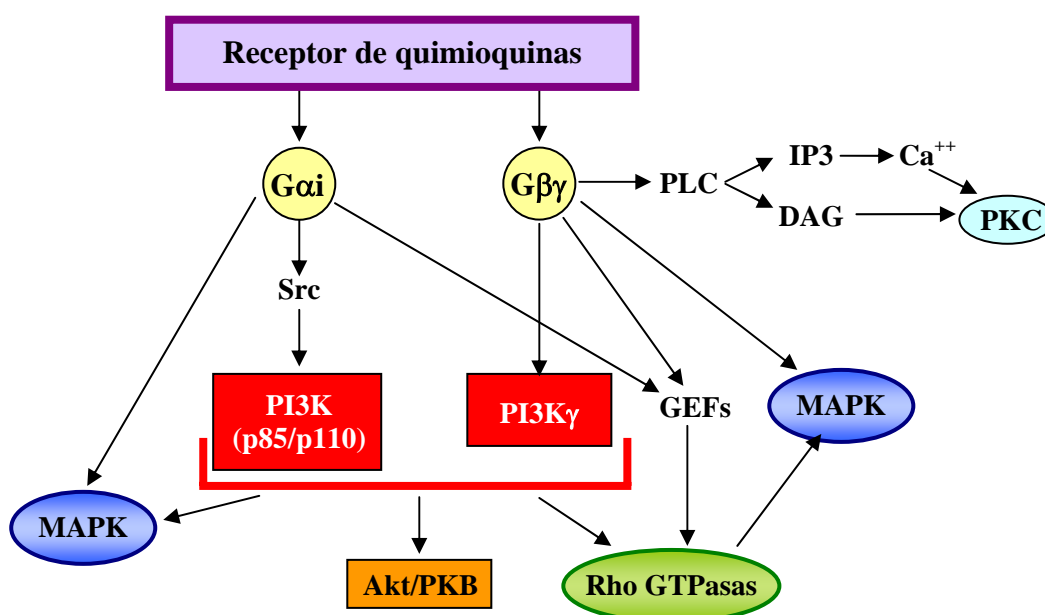


Figura 3. Esquema general de las principales vías de señalización activadas por la unión de las quimioquinas a sus receptores.

La unión de las quimioquinas a sus receptores induce la disociación de la subunidad $G\alpha_i$ del receptor y del heterodímero $G\beta\gamma$, y ambos complejos son responsables del inicio de una cadena de reacciones que activan distintas vías de señalización intracelular (Thelen, 2001; Ono *et al.*, 2003; Kehrl, 2006) (Figura 3). La subunidad α_i activa, entre otros, la fosfatidilinositol-3-OH-quinasa (PI3K), la familia Rho de pequeñas GTPasas y la familia de proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, del inglés “*mitogen-activated protein kinases*”). El dímero $\beta\gamma$ activa dos enzimas principales de la transducción de señales, la fosfolipasa C (PLC), que genera dos mensajeros secundarios, inositol-(1,4,5)-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), y la PI3K. Además, se acopla indirectamente a la pequeña GTPasa Ras para activar la cascada de las MAPKs. Por otra parte, la PI3K genera fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato [PtdIns(3,4,5)P3 o, comúnmente, PIP3], y activa otras moléculas cruciales como Akt, también llamada proteína quinasa B (PKB), y la cascada de las

MAPKs. Además, parece que todas las proteínas G regulan la actividad de pequeñas GTPasas como Rap y Rho (Marinissen y Gutkind, 2001; Kinashi, 2005). Aunque cada uno de estos efectores puede existir en múltiples isoformas, sólo algunas específicas son reguladas por las subunidades α y $\beta\gamma$.

Por otra parte, las respuestas celulares a las quimioquinas son, típicamente, rápidas y transitorias. De forma crucial, la desensibilización de los CKR permite su continua redistribución en los leucocitos para mantener una sensibilidad quimiotáctica polarizada y, por tanto, es un requerimiento para la migración leucocitaria direccional (Neel *et al.*, 2005).

2.2. FAMILIA DE LAS MAPKs

Muchas señales extracelulares convergen en la familia de serina/treonina proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y por estrés (SAPK, del inglés “*stress-activated protein kinases*”), presente en todos los eucariotas (Dong *et al.*, 2002; Krens *et al.*, 2006) (Figura 4).

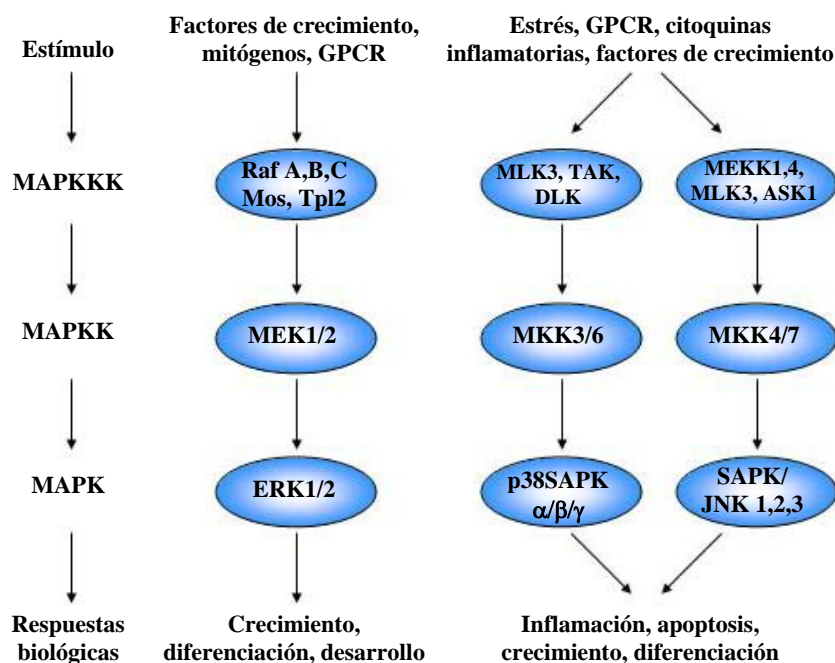


Figura 4. Esquema de activación de las principales MAPKs. Las MAPKs se activan por un mecanismo en cascada en el cual, cada MAPK es activada por doble fosforilación en residuos de treonina y tirosina en un motivo TXY regulador por quinasas conocidas como MAPK quinasas o MKKs. Las MKKs son, a su vez, activadas por MKK quinasas (MKKKs).

Se han identificado tres grupos principales de MAPKs de mamífero: **p44/p42 MAPK** o **ERK1/2** (del inglés “*extracellular-regulated kinase-1/2*”), **p38SAPK** (Ashwell, 2006) y **JNK1/2/3** (del inglés “*c-Jun N-terminal kinases*”) (Weston y Davis, 2007). Se han implicado en el control de muchos procesos celulares fundamentales que incluyen proliferación, apoptosis, supervivencia, oncogénesis, diferenciación, inflamación y respuestas de estrés. Además, existen múltiples evidencias de que la vía de las MAPKs juega un importante papel en la activación de integrinas y la quimiotaxis mediadas por quimioquinas y, en concreto, en la migración de DCs dependiente de CCR7 (Scandella

et al., 2004; Riol-Blanco *et al.*, 2005). Estudios relativamente recientes han identificado un gran número de sustratos tanto de ERK1/2, como de JNK y p38SAPK, relacionados con la polimerización de actina y la quimiotaxis (Huang *et al.*, 2004).

ERK1/2 media las señales de muchos factores de crecimiento y GPCR (Kolch, 2005). Su activación por GPCR se produce a través de la vía Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2, que comienza con la liberación del dímero $\beta\gamma$ de la proteína G_i , aunque también se ha demostrado su activación independiente de Ras mediante un mecanismo que implica a la PI3K (Curnock *et al.*, 2002). Se ha propuesto, además, que Raf-1 posee una función de anclaje en la regulación de la vía de la pequeña GTPasa Rho (Ehrenreiter *et al.*, 2005). ERK1/2 se ha implicado en la migración de numerosos tipos celulares y, aunque no hay duda de que las quimioquinas inducen su activación, no está tan claro si ésta es necesaria para la quimiotaxis mediada por quimioquinas.

2.3. FAMILIA DE PEQUEÑAS GTPasas Rho

Una respuesta temprana a la estimulación de GPCR es la reorganización del citoesqueleto de actina, la cual está regulada por la familia de pequeñas GTPasas Rho y sus efectores. Constituye una gran subfamilia de la superfamilia Ras, e incluye las proteínas **Cdc42**, **Rac** y **Rho**. Juegan un papel crítico en la organización del citoesqueleto, la polaridad celular y la motilidad en diferentes sistemas celulares, incluidos los linfocitos (Reif y Cantrell, 1998). Además, se ha sugerido un papel de estas proteínas en la formación y progresión de tumores *in vivo* (Malliri y Collard, 2003). Asimismo, pueden afectar a otras cascadas de señalización como la vía de las MAPKs (Frost *et al.*, 1996).

Estas proteínas poseen actividad GTPasa intrínseca y su estado conformacional puede cambiar entre una forma activa unida a GTP y una forma inactiva unida a GDP (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Tres tipos de moléculas regulan su estado: **GEF** (del inglés “*guanine nucleotide exchange factors*”), que promueven el cambio de GDP a GTP, **GAP** (del inglés “*GTPase-activating proteins*”), que aumentan la actividad GTPasa intrínseca de estas proteínas, y **GDI** (del inglés “*guanine nucleotide dissociation inhibitors*”), que interaccionan con las formas unidas a GDP e inhiben el intercambio de GDP por GTP (Figura 5).

Uno de los efectores más conocidos de la proteína Rho es la serina/treonina quinasa **ROCK I** y **II** (del inglés “*Rho-associated kinase*” o “*Rho coiled-coil associated kinase*”) (Riento y Ridley, 2003). ROCK aumenta la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC, del inglés “*myosin light chain*”) mediante fosforilación directa o inhibición de la fosfatasa de la MLC y, en consecuencia, regula la contracción de actina y miosina. Otra diana de ROCK es la quinasa LIM, la cual fosforila e inhibe la proteína cofilina, induciendo la estabilización de actina F. Un inhibidor competitivo de ROCK, Y-27632, ha permitido dilucidar muchas de sus funciones celulares. La vía de señalización Rho/ROCK se ha implicado en la respuesta quimiotáctica de varios tipos celulares como, por ejemplo, en la respuesta linfocitaria a CXCL12 (Vicente-Manzanares *et al.*, 2002).

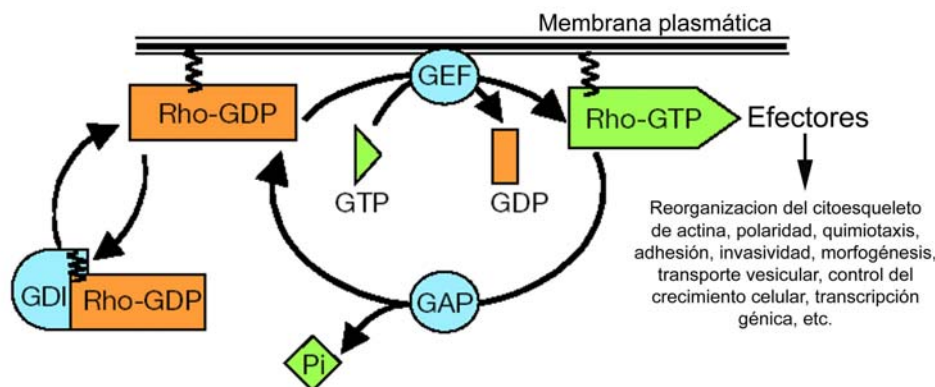


Figura 5. Ciclo de la familia Rho de pequeñas GTPasas. Adaptada de Etienne-Manneville *et al.*, Nature 2002.

2.4. FAMILIA DE FOSFATIDILINOSITOL-3'-OH-QUINASAS (PI3Ks)

Las **PI3Ks** están implicadas en la regulación de muchos tipos de respuestas celulares, incluyendo supervivencia, proliferación, crecimiento, tráfico de membrana, transporte de glucosa y metabolismo, así como en la reorganización del citoesqueleto de actina y la quimiotaxis (Wymann *et al.*, 2003). Constituyen una familia grande y compleja de enzimas heterodiméricas con actividad lípido y serina/treonina proteína quinasa (Vivanco y Sawyers, 2002; Okkenhaug y Vanhaesebroeck, 2003). Catalizan la fosforilación de la posición 3'-OH de grupos inositol de fosfoinosítidos, que actúan como segundos mensajeros.

Se pueden dividir en tres clases principales (I, II y III), en función de sus sustratos específicos, estructura y probable modo de regulación. Las PI3Ks de clase I se subdividen a su vez en dos clases, IA y IB, las cuales, de forma general, transmiten señales de tirosina quinasas y GPCR, respectivamente (Procko y McColl, 2005). Las enzimas de **clase IA** son heterodímeros que consisten en una subunidad catalítica p110 α , β o δ , y una subunidad reguladora de la que existen hasta siete isoformas. Éstas se originan mediante procesamiento alternativo de tres genes diferentes (p85 α , p85 β y p55 γ). La subunidad reguladora es responsable de las interacciones proteína-proteína a través de la unión de sus dominios SH₂ C-terminales (del inglés "Src homology 2") con residuos de fosfotirosina de otras proteínas. Además, posee un dominio SH₃ N-terminal y un dominio de homología RhoGAP. Cdc42 y Rac pueden unirse a este último dominio de p85 y estimular su actividad *in vitro*. La subunidad catalítica p110 contiene, entre otros, un dominio de unión a Ras.

La **clase IB** consiste en una única subunidad catalítica p110 γ y tres subunidades reguladoras [p101, p87 (Voigt *et al.*, 2006) y p84 (Suire *et al.*, 2005)]. Los estudios se han centrado en el heterodímero p101/p110 γ (PI3K γ), el cual se expresa principalmente en células hematopoyéticas (Stephens *et al.*, 2002). Se activa por las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G (Stephens *et al.*, 1997), aunque algunos GPCRs, incluyendo los CKR, pueden activar la PI3K heterodimérica p85/p110 de clase IA (Turner *et al.*, 1998; Vicente-Manzanares *et al.*, 1999; Curnock y Ward, 2003).

La migración leucocitaria podría requerir ambos tipos de quinasas, aunque se ha estudiado más profundamente el papel de PI3K γ . Su activación es fundamental, entre otros, para la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos (Sasaki *et al.*, 2000; Weiss-Haljití *et al.*, 2004), pero su papel en la migración linfocitaria (Nombela-Arrieta *et al.*, 2004; Reif *et al.*, 2004; Ward, 2006) ha generado mucha controversia y parece depender tanto del CKR implicado, como del tipo celular y su estadio de diferenciación.

Tanto las PI3Ks de clase IA como IB desencadenan la activación de cascadas de señalización a partir de proteínas con dominios de tipo pleckstrina (PH). El efector mejor estudiado es la serina/treonina quinasa Akt/PKB (Hanada *et al.*, 2004). Se activa por reclutamiento a la membrana plasmática a través de la interacción con PIP3 y la fosforilación en Thr308 por una quinasa con dominio PH llamada PDK1 (del inglés “*PIP3-dependent protein kinase-1*”), y en Ser473 por una quinasa no identificada denominada PDK2. Akt es un componente de señalización crítico en las vías de supervivencia mediadas por citoquinas, además de mediar muchos otros procesos biológicos como la proliferación y el crecimiento celular (Song *et al.*, 2005). Por otra parte, PDK1 fosforila y activa la proteína quinasa C- ζ atípica (PKC ζ) (Le Good *et al.*, 1998), la cual está implicada en una vía para estabilizar los microtúbulos en el frente de avance de células que están migrando y es importante, entre otros, para la quimiotaxis de neutrófilos en respuesta a CXCL8 (Laudanna *et al.*, 1998).

Las proteínas con dominios PH de, posiblemente, mayor importancia para la quimiotaxis, son los factores que regulan las pequeñas GTPasas de la familia Rho. Tanto GAPs como GEFs (por ejemplo, Vav-1 y Tiam-1) pueden contener uno o más dominios PH, enlazando la vía de las PI3K a las Rho GTPasas, incluyendo Rac, Rho y Cdc42 (Tamás *et al.*, 2003).

Asimismo, se ha demostrado que PI3K puede activar la cascada de MAPKs a través de diversos mecanismos. PI3K γ estimula una tirosina quinasa que fosforila una molécula adaptadora *Shc* (López-Illasaca *et al.*, 1997). *Shc* recluta la maquinaria de activación de Ras, iniciando una serie de fosforilaciones que llevan a la activación de las MAPKs. Igualmente, se ha descrito la activación de MEK y MAPK a través de una vía que implica la activación de PKC ζ atípica dependiente de PI3K γ (Takeda *et al.*, 1999), sin olvidar que PI3K γ (Bondev *et al.*, 1999), así como PDK-1 (Sato *et al.*, 2004), pueden fosforilar directamente MEK-1.

3. ÓRGANOS LINFOIDES

Para favorecer las interacciones celulares necesarias para el desarrollo de respuestas inmunes específicas, la mayoría de linfocitos, APC y otras células accesorias, se agrupan formando órganos discretos encapsulados, o bien acúmulos difusos de tejidos linfoides, donde los antígenos (Ags) extraños son transportados y concentrados. Los órganos linfoides se clasifican en **primarios** o **centrales** y en **secundarios** o **periféricos** (Janeway *et al.*, 2000; Abbas y Lichtman, 2003):

- Los **órganos primarios** son el principal origen de linfopoyesis. Incluyen la **MO**, donde se generan las células linfoides y maduran los linfocitos B (LB), y el **timo**, donde los linfocitos T (LT) maduran y adquieren su inmunocompetencia.
- Los **órganos secundarios** proporcionan el medio en el que las células implicadas en la respuesta inmune pueden interactuar entre sí y con el Ag. Incluyen los **ganglios linfáticos (GL)**, el **bazo** y los **tejidos linfoides asociados a mucosas** [MALT, del inglés “*mucosa-associated lymphoid tissue*”: amígdalas, placas de Peyer (PP) del intestino y acúmulos linfoides del tracto urogenital].

3.1. ESTRUCTURA DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS

Los ganglios son pequeños agregados nodulares de tejido linfóide situados a lo largo de los vasos linfáticos a través de todo el cuerpo. Junto a éstos, conforman una compleja red corporal cuya función es filtrar los Ags procedentes del espacio extracelular y de la linfa durante su circulación desde la periferia hasta el conducto torácico.

Cada ganglio está rodeado por una cápsula fibrosa con numerosos vasos linfáticos aferentes que vacían la linfa en el seno subcapsular. En el interior se distingue un área B denominada **córtex** o corteza, un área T llamada **paracorteza** o área **parafolicular**, y un área medular interna (**Figura 6**).

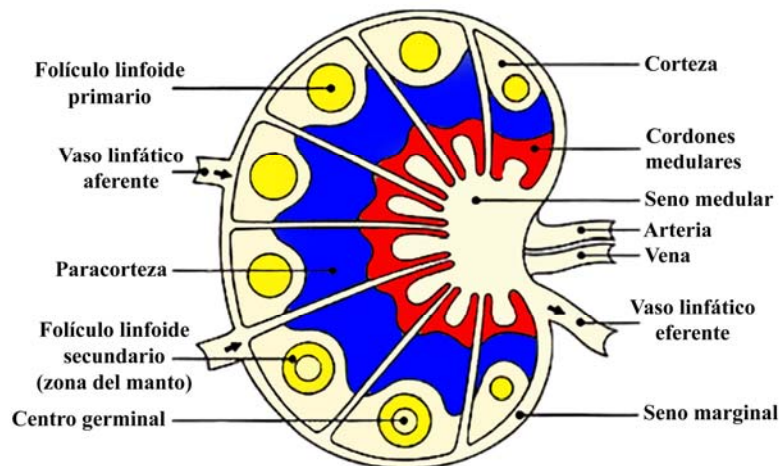


Figura 6. Estructura general de un ganglio linfático. Adaptada de Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. Conceptos básicos de inmunología. En: Inmunobiología. 4ª ed. Barcelona: Ed. Masson; 2000. p: 1-31.

En la **corteza periférica** o **córtex** los LB se organizan en folículos. Los folículos primarios contienen predominantemente LB maduros no estimulados por el Ag. Tras la estimulación por su Ag específico y células T específicas, forman folículos secundarios con un área central denominada **centro germinal (CG)**, y una región periférica denominada **zona del manto** de células B no activadas recirculantes. Las DCs foliculares, que residen en los CG, muestran el Ag en su superficie y activan selectivamente células B de alta afinidad. Los LB estimulados proliferan y se originan LB de memoria y células plasmáticas que producen anticuerpos (Acs) con alta afinidad por el Ag, las cuales migran fuera de los CG hacia la MO y otros tejidos.

Los LT, en su mayoría CD4⁺ colaboradores, se localizan predominantemente en zonas situadas entre los folículos y en la corteza profunda, llamadas **áreas parafoliculares o paracorteza**, donde buscan su Ag específico. DCs interdigitantes, así como otras células accesorias, presentan el Ag a los LT en estas áreas.

La **zona medular** presenta algunos cordones linfoides separados por espacios vasculares (senos medulares) que contienen la mayor parte de las células plasmáticas y los macrófagos sinusales de los GL.

En las áreas T y B, los linfocitos y las APC están en estrecha proximidad, lo cual permite una extensiva exploración de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y la iniciación de respuestas inmunes específicas.

4. QUIMIOQUINAS Y TRÁFICO LEUCOCITARIO

El tráfico leucocitario está altamente regulado y coordinado para asegurar el adecuado desarrollo, activación y función de las distintas poblaciones leucocitarias. Los patrones de migración varían ampliamente entre los diferentes tipos de leucocitos y están regulados, principalmente, por las quimioquinas y sus receptores junto con las moléculas de adhesión. Nos vamos a centrar en el tráfico linfocitario (Cyster, 2005; Stein y Nombela-Arrieta, 2005).

4.1. HOMING LINFOCITARIO A ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

Después de su desarrollo en el timo y la MO, los linfocitos *naïve* maduros, con receptores para quimioquinas de OLS, no son reclutados a tejidos periféricos, sino que recirculan entre la sangre y órganos como el bazo, GL periféricos y mesentéricos y PP, a los que entran a través de vénulas pos-capilares especializadas de endotelio alto (HEV, del inglés “*high endothelial venules*”). En dichos órganos, los linfocitos B y T se sitúan en compartimentos separados (folículos y áreas T, respectivamente), donde encuentran DCs presentadoras del Ag. Si tras varias horas no han encontrado su Ag específico, migran de vuelta a la circulación a través de vasos linfáticos eferentes y del conducto torácico, en un proceso mediado, entre otros, por la esfingosina-1-fosfato y su receptor (Matloubian *et al.*, 2004). En cambio, cuando su Ag es detectado, las células B y T colocalizan para iniciar la respuesta inmune.

El mecanismo de extravasación de los leucocitos circulantes del flujo sanguíneo al interior de estos tejidos, a través de las HEV, se produce mediante una serie de interacciones secuenciales con el endotelio vascular (Springer, 1994; Von Andrian y Mempel, 2003; Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2004) (Figura 7):

- **Tethering y rolling:** Las uniones iniciales (*tethering*) de los leucocitos al endotelio están mediadas, principalmente, por la interacción de la molécula L-selectina (CD62L), expresada en la mayoría de los leucocitos, con sus ligandos en el endotelio vascular (PNAds “*peripheral node addresins*” o MadCAM-1 “*mucosal cells adhesion molecule-1*”). Estas moléculas sólo se expresan en HEV de GL periféricos y PP. Dichas interacciones median el *rolling* o rodamiento de los leucocitos en el endotelio, en un proceso que no requiere quimioquinas. Sin embargo, se ha visto que algunas son capaces de desestabilizar el *rolling* de los linfocitos, sugiriendo que podrían regular este proceso (Grabovsky *et al.*, 2002).
- **Adhesión firme:** La parada o adhesión firme de los leucocitos en la superficie del endotelio está mediada por la interacción de las integrinas VLA-4 y LFA-1 con VCAM-1 e ICAM-1, respectivamente, y depende completamente de las quimioquinas presentes en la superficie endotelial, las cuales son cruciales para inducir un estado de activación de alta afinidad/avidez de las integrinas.
- **Migración transendotelial (diapédesis):** A continuación, las células sufren la migración transendotelial al parénquima del tejido de sostén, donde son guiadas por las quimioquinas y otros quimioatrayentes a los tejidos específicos. Para encontrar su localización apropiada, los leucocitos pueden migrar en respuesta a múltiples gradientes quimiotácticos.

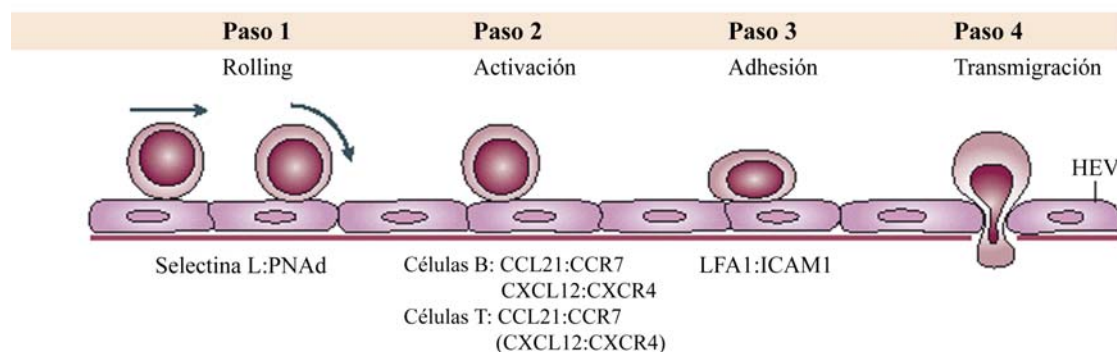


Figura 7. Principales pasos del mecanismo de extravasación leucocitaria. Adaptada de Von Andrian UH y Mempel TH, Nat Reviews 2003.

El **homing de células T naïve** a tejidos linfoides secundarios está mediado por la expresión de CCR7, que reconoce las quimioquinas CCL19 y CCL21 presentes en la cara luminal de HEV y vasos linfáticos, así como en el interior de las zonas T de GL y PP (Gunn *et al.*, 1998; Willmann *et al.*, 1998). CCL19 y CCL21 pueden inducir el estado de alta afinidad de la integrina $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ LFA-1 e inducir un rápido, pero transitorio, aumento de la adhesión linfocitaria a ICAM-1 (Constantin *et al.*, 2000). Además, CCL21 induce la adhesión linfocitaria dependiente de $\alpha\text{4}\beta\text{7}$ a MadCAM-1, la cual se expresa en HEV de ganglios mesentéricos y PP, así como en células endoteliales vasculares de las zonas marginales del bazo (Pachynski *et al.*, 1998).

Tradicionalmente, se ha considerado que las HEV expresan constitutivamente CCL21, mientras que CCL19 es producida, fundamentalmente, por DCs y otras células estromales de las áreas T de los ganglios, y puede sufrir un proceso de transcitosis a través de la barrera endotelial para ser presentada en la superficie luminal de HEV (**Baekkevold et al., 2001**). Sin embargo, se ha observado que las células de HEV humanas no sintetizan CCL21, a diferencia de lo que ocurre en ratón, a pesar de que sí se detecta la proteína (**Carlsen et al., 2005**). Por tanto, parece que el reclutamiento linfocitario a tejidos linfoides depende de la transcitosis tanto de CCL19, como de CCL21, a través de las células de HEV.

La importancia de CCR7 y sus ligandos en la entrada de células T a GL se ha demostrado claramente en estudios con ratones genéticamente deficientes en CCR7 (**Förster et al., 1999**) o con una mutación espontánea *plt* (del inglés “*paucity of lymph node T-cell*”) (**Gunn et al., 1999**), que resulta en una producción defectiva de CCL19 y CCL21. Ambos ratones muestran un número muy reducido de células T *naïve* en los GL, debido a su incapacidad para adherirse firmemente y transmigrar a través de las HEV.

El **homing de células B** a GL y PP resulta menos afectado por la deficiencia de CCR7 o sus ligandos, indicando que las células B pueden tener distintos requerimientos de quimioquinas para su entrada en estos tejidos. Mediante la transferencia de células B deficientes en CXCR4 en el ratón *plt*, **Okada et al.** demostraron que la migración transendotelial de células B al interior de los GL está mediada por la acción redundante de CCR7 y CXCR4, así como que CXCR4 también participa a bajo nivel en el *homing* residual de células T que se observa en el ratón *plt* y en el deficiente en CCR7 (**Okada et al., 2002**). Se cree que las células B, al igual que los LT, entran a través de la zona T y, a continuación, se dirigen a los folículos por la acción de quimioatrayentes específicos. En cambio, en las PP, las células B pueden entrar directamente en los folículos vía HEV foliculares, proceso mediado, fundamentalmente, por el receptor CXCR5.

Es importante señalar que CCR7 juega un papel clave en la **migración de DCs**. La expresión de CCR7 aumenta durante el proceso de activación y maduración de las DCs que han captado el Ag en tejidos no linfoides (**Sánchez-Sánchez et al., 2006**). De esta forma, migran a los vasos linfáticos aferentes en respuesta a CCL21. Una vez en los ganglios de drenaje, siguen un gradiente de CCL19 y CCL21 para dirigirse hacia la zona T, donde se hacen residentes como DCs interdigitantes y presentan los Ags a los LT.

4.2. INTERACCIÓN T/B EN EL INTERIOR DE LOS TEJIDOS LINFOIDES

Después de cruzar la barrera endotelial, los leucocitos migran en respuesta a un gradiente quimiotáctico hacia una localización precisa dentro de los tejidos. Las quimioquinas homeostáticas CCL19, CCL21 y CXCL13 se expresan constitutivamente dentro de OLS y regulan la entrada y organización funcional de los linfocitos y DCs (**Ohl et al., 2003; Cyster, 2005**).

Las **células T naïve**, una vez en el interior de los OLS, se encuentran continuamente en movimiento a través de la zona paracortical en busca de sus Ags presentados por moléculas MHC. La expresión constitutiva de los ligandos de CCR7 por DCs y células estromales es fundamental para esas migraciones (**Okada y Cyster, 2007**), que probablemente no se pueden considerar quimiotaxis, sino migración al azar debido a la distribución uniforme de las quimioquinas en el parénquima linfoide (**Miller et al., 2004; Sumen et al., 2004**).

La activación de los linfocitos por su Ag específico se acompaña de variaciones en la respuesta a quimioquinas, fundamentales para que se produzca la colaboración T-B necesaria para la generación de respuestas de Acs de alta afinidad en los CG (**Bowman et al., 2000**). Así, las células B y T CD4+ específicas del Ag, inicialmente activadas en diferentes microambientes de las áreas T y B, se encontrarán entre todas las células no específicas presentes migrando hacia un lugar común de encuentro: la *zona del límite folicular* (**Garside et al., 1998**). La correcta distribución de los linfocitos en el límite folicular parece depender, fundamentalmente, de la integración de las señales de quimioquinas tanto de la zona T como B adyacentes a través de CCR7 y CXCR5. Tras la activación de las células T CD4+, disminuye la respuesta a los ligandos de CCR7, y aumenta su expresión de CXCR5 (**Hardtke et al., 2005**). La menor respuesta a CCL19/21 lleva a las células T a excluirse de la zona central del área T. Como resultado, las células pueden responder a CXCL13 producida en los folículos.

La baja respuesta a los ligandos de CCR7 es también una característica de células T de memoria efectoras (**Sallusto et al., 1999**) y puede actuar, junto con una reducida expresión de L-selectina, para disminuir el *homing* de células de memoria a órganos linfoides y, por tanto, promover su migración hacia tejidos periféricos.

De la misma manera, el Ag es el principal responsable de reprogramar la respuesta quimiotáctica de **células B** durante la respuesta humoral (**Casamayor-Pallejà et al., 2002**) (**Figura 8**). La localización de los LB en los OLS está determinada por su capacidad de respuesta relativa a las citoquinas de zonas T y B (**Reif et al., 2002**). En LB naïve, el balance está a favor de CXCL13, y las células migran a los folículos. La ligación del BCR produce un cambio en el balance que favorece la respuesta a quimioquinas de la zona T. Las recién activadas células B expresan mayores niveles de CCR7 que sus equivalentes naïve, que les permiten dirigirse hacia el límite folicular. Además, la estimulación del BCR promueve la expresión de quimioquinas que atraen células T CD4+ activadas. Una vez activadas las células B, constituyen folículos secundarios con CG, mediado por la respuesta a CXCL13 y la disminución de la expresión de CCR7. Por último, las células plasmáticas diferenciadas presentan una respuesta reducida a quimioquinas, tanto de la zona B, como T. En cambio, responden a CXCL12 que promueve su migración, preferentemente, a la MO (**Hargreaves et al., 2001**).

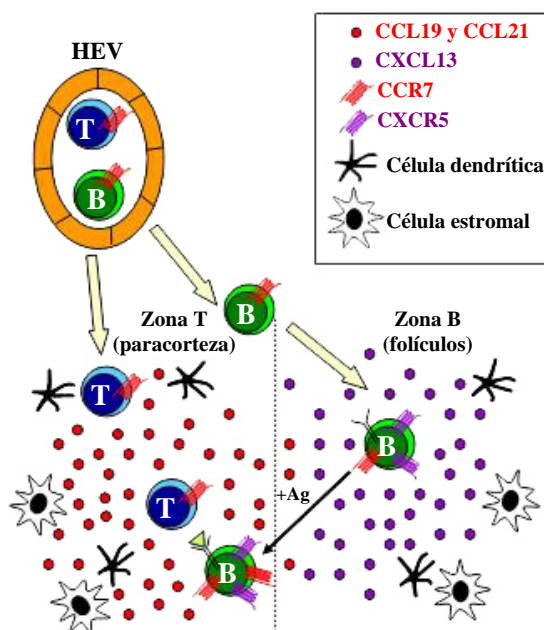


Figura 8. Esquema del tráfico leucocitario en el interior de los ganglios linfáticos.

4.3. CCR7 Y SUS LIGANDOS: CCL19 y CCL21

En resumen, dos quimioquinas fundamentales en el *homing* de linfocitos *naïve* y DCs a GL y en el correcto desarrollo de la microarquitectura dentro de OLS, son las quimioquinas homeostáticas: **SLC/6Ckine/Exodus2/CCL21** (Hedrick y Zlotnik, 1997; Yoshida *et al.*, 1998) y **ELC/MIP3 β /CKbeta-11/CCL19** (Nagira *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1997), que comparten un receptor común, **CCR7** (Birkenbach *et al.*, 1993; Schweickart *et al.*, 1994). CCL21 difiere de CCL19 en que contiene un dominio adicional de 30 aminoácidos altamente básico, con dos residuos de Cys extra en el extremo C-terminal. Aunque no se excluye un papel de CCL19 en promover la parada de linfocitos mediada por integrinas en HEV, parece probable que CCL21 sea la principal responsable a través de su dominio adicional, el cual une la molécula a proteoglicanos de la superficie de HEV (Proudfoot *et al.*, 2003). Además, CCL21 se expresa en las células endoteliales linfáticas que revisten los linfáticos aferentes de tejidos periféricos, donde media la migración de DCs a los ganglios de drenaje (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2006) y la salida de LT de tejidos periféricos (Bromley *et al.*, 2005; Debes *et al.*, 2005).

Los estudios en ratones CCR7^{-/-} y *plt* no han permitido discriminar entre el efecto de ambos ligandos, aunque diferencias en su patrón de expresión tisular pueden indicar distintos papeles *in vivo*. Por ejemplo, CCL19 se expresa mucho más en timo que CCL21. A su vez, CCL21, pero no CCL19, se expresa en corazón, páncreas, glándula tiroides, etc. Se ha visto, además, que la expresión de ambas aumenta en lesiones ateroscleróticas (Damas *et al.*, 2007), ¿significa que estas moléculas pueden jugar un papel en sitios de inflamación? En conclusión, quedan muchas preguntas sin resolver, por ejemplo: ¿podría haber otros receptores?, ¿cuál es el papel relativo de cada una?, ¿se requiere CCL19 porque las células se desensibilizan para CCL21 en el proceso de extravasación?, etc.

4.4. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INDUCIDA POR CCR7

En los últimos años han comenzado a caracterizarse las vías de señalización implicadas en la quimiotaxis inducida por CCR7 en distintas subpoblaciones leucocitarias. Inicialmente se confirmó el papel de proteínas $G\alpha_i$, mediante el tratamiento celular con PTX, en el flujo de calcio, quimiotaxis, activación de integrinas y *homing* linfocitario inducidos por los ligandos de CCR7 (Campbell *et al.*, 1998; Gunn *et al.*, 1998; Pachynski *et al.*, 1998; Tangemann *et al.*, 1998; Warnock *et al.*, 1998; Thelen, 2001).

En linfocitos se ha observado la activación de PI3K tras estimulación con CCL19 y CCL21 (Constantin *et al.*, 2000), así como la implicación de PI3K γ en la quimiotaxis dependiente de CCR7 en LT (Reif *et al.*, 2004). Por el contrario, un estudio reciente indica que la movilidad de LT inducida por CCR7 en los GL se produce de manera independiente de PI3K (Asperti-Boursin *et al.*, 2007). Parece cierto, sin embargo, que el *homing* linfocitario inducido por CCR7 depende, fundamentalmente, de la proteína DOCK2 (del inglés “*dedicator of cytokinesis 2*”), una proteína relacionada con la activación de Rac (Fukui *et al.*, 2001; Nombela-Arrieta *et al.*, 2004). Se ha observado, asimismo, la inhibición de la quimiotaxis mediada por CCR7 de LT y linfocitos primarios de ratón por tratamiento, respectivamente, con el inhibidor de ROCK Y-27632 (Bardi *et al.*, 2003) y del inhibidor TyrAG490 de la familia de quinasas Janus (Jak) (Stein *et al.*, 2003). Por otro lado, la quimiotaxis de LB en respuesta a CCL21 (Badr *et al.*, 2005) es dependiente de PLC, RhoA, PI3K δ (Reif *et al.*, 2004) y PI3Ks diferentes de clase I, e independiente de la activación de ERK1/2.

Diversos estudios se han centrado en el análisis de las vías implicadas en DCs. En este caso, en la quimiotaxis en respuesta a CCL19 y CCL21, es fundamental la vía de las MAPKs, pero no de PI3K (Ardeschna *et al.*, 2002; Scandella *et al.*, 2004; Iijima *et al.*, 2005; Riol-Blanco *et al.*, 2005). Asimismo, se ha descrito también un papel de ROCK (Iijima *et al.*, 2005) y PLC (Scandella *et al.*, 2004).

5. RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS Y METÁSTASIS

5.1. CÁNCER Y METÁSTASIS

Cáncer es el resultado de una alteración en los mecanismos de proliferación, diferenciación o supervivencia celulares, que escapa a los mecanismos de control del organismo. La agresividad de un cáncer está relacionada, entre otros, con su capacidad para establecer focos de tumores secundarios o **metástasis**, siendo esta propiedad la principal causa de la mortalidad asociada al cáncer. Por tanto, controlar las metástasis es un objetivo primordial si queremos mejorar la expectativa de vida de los pacientes. Sin embargo, hasta los últimos años, no se tenía mucha información acerca de los mecanismos moleculares subyacentes que llevan a su formación.

Un hecho claro en la actualidad es, que dependiendo del tipo de cáncer, las metástasis se producen preferentemente en determinadas localizaciones y no al azar, ni siquiera tienen que corresponder con los sitios preferidos de drenaje del área u órgano donde el tumor original se produjo. Ciertamente, en pacientes con enfermedad muy avanzada, los aspectos mecánicos de las metástasis pueden ser importantes, y los focos metastásicos encontrarse a lo largo de todo el organismo. En este estadio el pronóstico es muy malo y las opciones de tratamiento muy limitadas. De forma que, desde un punto de vista terapéutico, es fundamental comprender los mecanismos que determinan las fases iniciales de metastatización, ya que la inhibición de su formación puede establecer una diferencia fundamental en el pronóstico de los pacientes. Y es, probablemente, en estos primeros estadios, donde los mecanismos moleculares son fundamentales para definir el destino de las células metastásicas.

5.2. LAS QUIMIOQUINAS Y SU PAPEL EN LAS METÁSTASIS

A partir del descubrimiento de la expresión de CCR7 y CXCR4 por **Müller *et al.*** en cáncer de mama (**Müller *et al.*, 2001**), en los últimos años, muchos artículos han documentado la expresión de CKR por células tumorales. Estas observaciones sugirieron que, potencialmente, las quimioquinas juegan un papel fundamental en la migración tumoral dirigida *in vivo*.

Los principales CKR implicados en la formación de metástasis son **CXCR4** y **CCR7** (**Zlotnik, 2004; Kakinuma y Hwang, 2006**). CXCR4 parece ser fundamental en el establecimiento de metástasis en pulmón, hígado, MO y, quizás, en cerebro, localizaciones donde se expresa su ligando, CXCL12. CCR7 y sus ligandos son fundamentales en el establecimiento de metástasis en GL. Se ha comprobado cómo la transfección de una línea celular de melanoma no metastásica con CCR7 (**Wiley *et al.*, 2001**), le otorga la capacidad de migrar a GL *in vivo*. La transfección de la misma línea con CXCR4, produce su metastatización en pulmón (**Murakami *et al.*, 2002**).

Inhibidores de los CKR (Acs o moléculas pequeñas) podrían utilizarse en terapéutica para inhibir las metástasis en los estadios primarios del desarrollo del cáncer, como se ha comprobado en modelos animales para CXCR4 (**Müller *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2004**). Pero las metástasis son un fenómeno complejo que puede incluir, no sólo la capacidad de las células tumorales para migrar a una localización particular, sino también para establecerse y crecer. En este contexto, es posible que las quimioquinas ejerzan también efectos en la promoción del crecimiento de las células tumorales. Se ha visto, por ejemplo, que CXCL12 favorece el crecimiento de células de glioblastoma (**Sehgal *et al.*, 1998; Barbero *et al.*, 2003**).

6. LINFOMAS NO HODGKIN DE CÉLULAS B (LNH-B)

Los **LNH-B** constituyen un grupo muy diverso de síndromes linfoproliferativos de células B (SLP-B) que se caracterizan por un comportamiento clínico heterogéneo determinado, entre otros, por diferentes patrones migratorios e invasivos de las células malignas debido a razones que

desconocemos en la actualidad (Harris *et al.*, 2001; Evans y Hancock, 2003; Fernández-Rañada de la Gándara y Alegre Amor, 2005). Se identifican, mayoritariamente, por su similitud morfológica e inmunofenotípica con la observada en los diferentes estadios de diferenciación de los linfocitos. La clasificación REAL (del inglés “*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*”) (Harris *et al.*, 1994) los divide según el origen de la neoplasia en dos grupos fundamentales: el de las células precursoras, que incluye la leucemia aguda linfoblástica B (LAL-B), y el de las células maduras en sus distintos estadios de diferenciación, que incluye el resto de patologías, y en las que nos vamos a centrar fundamentalmente:

- **Linfoma del manto (MCL)**: Se considera que procede de células B periféricas recirculantes CD5+CD23- del manto folicular. Se encuentra normalmente diseminado al diagnóstico. La mayoría de los pacientes presentan linfadenopatías generalizadas, hepatomegalia y, frecuentemente, infiltración por células tumorales de bazo, MO y sangre periférica (SP).
- **Linfoma folicular (FL)**: Es un linfoma derivado de células B con características de células de CG. La mayoría de los pacientes presentan enfermedad diseminada al diagnóstico, con adenopatías centrales y periféricas, e infiltración medular en el 60-80% de los casos. Ocasionalmente, puede implicar SP y sitios extranodales.
- **Linfomas de la zona marginal (MZL)**: Deriva de células B posgerminales de la zona marginal, la cual rodea los folículos primarios y la zona del manto de los folículos secundarios. Puede presentarse, con baja frecuencia, como linfoma marginal ganglionar con afectación de GL periféricos o, más habitualmente, como linfoma marginal extraganglionar del MALT, localizándose sobre todo en el tracto gastrointestinal.
- **Linfoma esplénico de la zona marginal (SMZL)**: Es clínicamente diferente al MZL, a pesar de que también procede de células posgerminales que han sufrido selección antigénica y de poseer un inmunofenotipo similar. Cursa con afectación esplénica primaria. Se observa un infiltrado que sustituye a la pulpa blanca del bazo e infiltra la pulpa roja. Los pacientes normalmente tienen infiltración de MO y SP. No suelen detectarse adenopatías periféricas.
- **Tricoleucemia (HCL) o leucemia de células peludas**: Es un síndrome linfoproliferativo crónico, poco común, de curso indolente caracterizado por esplenomegalia, pancitopenia, infiltración de la MO, mayor susceptibilidad a infecciones y tricoleucocitos circulantes con finas prolongaciones citoplasmáticas, sin equivalente celular normal conocido.
- **Linfoma linfoplasmacítico (LPL)**: Es un subtipo muy poco frecuente constituido por células linfoplasmocitoides y células plasmáticas. La mayoría de los pacientes tienen un componente

monoclonal que, en ocasiones, tiene actividad de autoanticuerpo o crioaglutinina. Normalmente implica a la MO y el bazo. Y menos frecuentemente, SP o sitios extranodales.

- **Mieloma múltiple (MM):** Es una neoplasia, generalmente confinada a MO, caracterizada por la proliferación de células plasmáticas patológicas y la presencia de una paraproteína monoclonal detectable en suero o en orina.

Por último, la mayor parte del trabajo se centra en la **Leucemia Linfática Crónica de células B (LLC-B)**, por lo que se comenta con más detalle en el siguiente apartado.

6.1. LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA DE CÉLULAS B

La LLC-B es la leucemia más frecuente del mundo occidental, constituyendo cerca del 30% de todas las leucemias (Chiorazzi *et al.*, 2005; Kokhaei *et al.*, 2005). La mediana de edad de los pacientes en el momento del diagnóstico es superior a los 60 años, sin embargo, al menos un 20% es menor de 55 años, y se espera que la proporción de pacientes más jóvenes siga aumentando debido al diagnóstico precoz en exámenes de rutina.

Se caracteriza por la expansión y acumulación incontrolada de un clon de células B malignas de aspecto maduro en tejidos linfoides secundarios, MO y SP que, o no mueren y se acumulan gracias a señales de supervivencia autocrinas y paracrinas, o bien sufren apoptosis y son sustituidos a partir de precursores con capacidad de proliferación. Las células leucémicas se caracterizan por la expresión de los Ags CD19, CD5 y CD23, así como por bajos niveles de inmunoglobulina de superficie (IgM, IgD), CD20, CD21, CD22 y CD79b. Cerca del 99% de las células LLC-B en SP están en fase G0/G1 del ciclo celular.

Siempre se consideró que procedía de LB inmaduros inmunológicamente incompetentes, pero parece que derivan de LB inmunocompetentes estimulados por el Ag. Expresan marcadores de superficie característicos de un fenotipo activado (Damle *et al.*, 2002). Además, el desarrollo en parte de los pacientes de mutaciones en los genes que codifican para la región variable de la cadena pesada de las Ig (IgV_H), implica una serie de procesos celulares iniciados por la unión del Ag al BCR. La ausencia de mutaciones podría indicar que, en este caso, derivan de células *naïve* inmaduras, pero estudios fenotípicos sugieren la estimulación antigénica en todos los casos. Los casos no mutados parecen células B que son temporalmente más próximas al estímulo inductivo que los mutados.

Pero a pesar de su heterogeneidad, en todos los pacientes, de forma característica, se encuentran infiltrados los GL, la MO y la SP al diagnóstico. En la exploración física de los pacientes, el hallazgo más constante son las adenopatías, pudiendo afectar a cualquier territorio ganglionar. La esplenomegalia es frecuente en fases avanzadas, pudiendo acompañarse con menos frecuencia de

hepatomegalia. Asimismo, también puede producirse infiltración extraganglionar. En el hemograma destaca la leucocitosis con linfocitosis absoluta característica.

La forma más común de clasificar los estadios clínicos de la LLC-B son los sistemas propuestos por **Binet (Binet et al., 1981)** y **Rai (Rai et al., 1975)**, los cuales definen un estadio de la enfermedad temprano (Rai 0, Binet A), intermedio (Rai I/II, Binet B) y avanzado (Rai III/IV, Binet C) (Tabla 3).

Clasificación de Binet			Clasificación de Rai				Super-vivencia ²
Estadio	Definición	% ¹	Grupo de riesgo	Estadio	Definición	%*	
A	<3 áreas linfoides ³	60	Bajo	0	Sólo linfocitosis	30	>10
B	>3 áreas linfoides	30	Intermedio	I	Linfadenopatías	25	
				II	Hepato o esplenomegalia ± linfadenopatías	25	1-3
C	Hemoglobina <10 g/dl o plaquetas <100x10 ³ /dl ⁴	10	Alto	III	Hemoglobina <11 g/dl ⁴	10	
				IV	Plaquetas <100x10 ³ /dl ⁴	10	

Tabla 3. Sistemas de Binet y Rai de estadiaje clínico de la LLC-B. Adaptada de Kokhaei et al., *Annals of Oncology* 2005. Ambas clasificaciones se basan en la extensión de las áreas linfoides infiltradas con células leucémicas y en la presencia de anemia y trombocitopenia. (1) % de pacientes. (2) Mediana de supervivencia global en años. (3) Se consideran cinco áreas linfoides: GL cervicales, axilares e inguinales (unilateral o bilateral), bazo e hígado. (4) Con exclusión de hemólisis y causas no relacionadas de anemia o trombocitopenia.

Aunque la mediana global de supervivencia es de, aproximadamente, 10 años, el curso clínico y el pronóstico son extremadamente heterogéneos entre los diferentes pacientes, en relación con una clara heterogeneidad molecular y celular. En ocasiones, la enfermedad tiene una progresión lenta, de forma que muchos pacientes no requieren nunca tratamiento y sucumben por otros problemas médicos. Pero en otros casos, la enfermedad progresa rápidamente, los pacientes requieren muy pronto tratamiento y pueden morir en poco tiempo tras el diagnóstico.

A pesar de la continua introducción de nuevas terapias, el trasplante alogénico de células hematopoyéticas es la única terapia potencialmente curativa de la LLC-B en la actualidad (Abbott, 2005). Pero su uso es infrecuente debido a la avanzada edad de la mayoría de los pacientes, y sólo debe ser considerado para pacientes jóvenes con mal pronóstico. Debido a esto, los tratamientos, en general, no son curativos, y están dirigidos a reducir los síntomas derivados de una carga creciente de la enfermedad.

6.2. FACTORES PRONÓSTICOS DE LA LLC-B

En los últimos años se han tratado de identificar factores pronósticos que pudieran predecir la progresión de la enfermedad como, por ejemplo, el tiempo de duplicación linfocitaria, mutaciones del gen p53, ciertas alteraciones genéticas, niveles de CD23 soluble, de β -2-microglobulina, etc.

Pero sin duda, el principal factor pronóstico, en la actualidad, es el **estado mutacional** del gen que codifica para **IgV_H** en las células malignas (**Damle *et al.*, 1999; Hamblin *et al.*, 1999**). De esta forma, la LLC-B se subdivide en dos grupos en función de la presencia (>2% de diferencias en la secuencia de nucleótidos con el gen de la línea germinal) o ausencia (<2% de diferencias) de mutaciones. La presencia de genes IgV_H no mutados correlaciona con una progresión más rápida de la enfermedad y una menor supervivencia (**Tabla 4**).

Otros factores pronósticos relevantes son la **expresión de CD38** (**Del Poeta *et al.*, 2001; Ibrahim *et al.*, 2001**) y de **ZAP-70** (**Crespo *et al.*, 2003; Wiestner *et al.*, 2003**). Inicialmente, se describió que la expresión de CD38 en superficie correlacionaba con la ausencia de mutaciones en los genes IgV_H. Posteriormente se ha cuestionado que dicha correlación sea exacta, pero la presencia de CD38 sigue siendo un marcador independiente de peor pronóstico clínico. La quinasa ZAP-70 es una proteína asociada a la cadena ζ del receptor de células T (TCR) que se expresa, de forma selectiva, en células T y NK. La mayoría de células B normales y neoplásicas no expresan ZAP-70 en cantidades significativas, pero altos niveles se detectaron en el subgrupo de LLC-B con los genes IgV_H no mutados. Por tanto, la sobreexpresión de ZAP-70 en los pacientes define un peor progreso clínico. Esta expresión se consideró aberrante, aunque después se ha descrito que células B normales activadas de CG y células plasmáticas tienen una proporción sustancial de ZAP-70 (**Cutrona *et al.*, 2006**), aunque mucho menor que los LT o células NK, mientras que células de memoria y del manto folicular, que apenas contienen células B activadas, expresan relativamente poco ZAP-70.

Características	LLC-B con genes IgV _H no mutados	LLC-B con genes IgV _H mutados
Mutaciones gen VH	Pocas o ninguna	Un número significativo
Edad de presentación	Sin diferencias	Sin diferencias
Necesidad de tratamiento	Común	Poco común
Expresión de CD38	Alta	Baja
Expresión de ZAP-70	Alta	Baja
Retención de la señalización por BCR	Sí	No

Tabla 4. La LLC-B se divide en dos subgrupos principales en función de la presencia o ausencia de mutaciones en los genes de las cadenas variables de las Ig. Adaptada de *Kokhaei et al., Annals of Oncology 2005*.

2-OBJETIVOS

Debido a la heterogeneidad que existe en el comportamiento clínico y migratorio de las distintas neoplasias de células B, decidimos estudiar si estas diferencias se debían, al menos en parte, a diferentes patrones de expresión de CKR. Los datos obtenidos sugerían un papel fundamental de CCR7 en la infiltración de los GL por las células neoplásicas, sobre todo, en la LLC-B. Por otro lado, a pesar de los avances producidos en los últimos años, no se conoce prácticamente nada acerca de las vías de señalización activadas por CCR7 que median la quimiotaxis celular y las metástasis ganglionares de diversos tumores. Falta por establecer si las señales intracelulares inducidas por CCR7 en las células tumorales son las mismas que median la migración homeostática de linfocitos normales o DCs a OLS, y si las quimioquinas están solamente mediando la migración de las células tumorales o si tienen efectos adicionales en otros rasgos distintivos del cáncer como la proliferación y la angiogénesis. Esta información podría ser interesante para desarrollar tratamientos más selectivos y apropiados para algunas enfermedades cancerígenas. Por estas razones, decidimos estudiar las moléculas de señalización intracelular implicadas en la migración de células de LLC-B hacia los ligandos de CCR7. Modular la migración de las células leucémicas podría ser muy útil para controlar la formación de metástasis y la progresión del cáncer.

Los objetivos concretos son los siguientes:

1. Estudiar los patrones de expresión de receptores de quimioquinas de neoplasias de células B para profundizar en el conocimiento de sus patrones de migración y metastatización.
2. Estudiar si el patrón de expresión de receptores de quimioquinas de una neoplasia B es similar al de su equivalente celular normal o es el resultado de una transformación neoplásica.
3. Caracterización funcional del receptor CCR7.
4. Estudiar una posible correlación de la quimiotaxis y la expresión de CCR7 en células de Leucemia Linfática Crónica de células B con la presencia de linfadenopatías y otros factores pronósticos.
5. Caracterización de las principales vías de señalización implicadas en la quimiotaxis mediada por CCR7 de células de Leucemia Linfática Crónica-B.

3-MATERIALES Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y CÉLULAS

Las muestras de aspirados de MO, SP o biopsias de GL fueron obtenidas de pacientes con diferentes neoplasias de células B cuyo diagnóstico se basó en la clasificación REAL (*Revised European American Lymphoma Classification*) (Harris *et al.*, 1994). El estudio de la expresión de CKR se realizó en muestras de donantes sanos (n=10) y de pacientes con las siguientes patologías: leucemia aguda linfoblástica-B (LAL-B) (n=6), leucemia linfática crónica típica de células B CD5+ (LLC-B CD5+) (n=91), leucemia linfática crónica atípica de células B CD5- (LLC-B CD5-) (n=12), linfoma de células del manto (MCL) (n=15), linfoma folicular (FL) (n=16), linfoma de la zona marginal (MZL) (n=7), linfoma esplénico de la zona marginal (SMZL) (n=8), tricoleucemia (HCL) (n=9), linfoma linfoplasmacítico (LPL) (n=8), mieloma múltiple (MM) (n=30), y linfocitosis policlonal persistente de células B (PPBL) (n=4).

Las amígdalas y los GL se obtuvieron, respectivamente, del departamento de Otorrinolaringología y de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de La Princesa (Madrid). Para la obtención de los linfocitos, se disgregaron las amígdalas y los ganglios y la suspensión celular obtenida se sometió a centrifugación en gradiente de densidad de ficol (Histopaque-1077 Sigma-Aldrich) para obtener las células mononucleares.

Las células B normales de MO se obtuvieron de donantes sanos para trasplante de MO alogénico con consentimiento previo informado. Para determinados experimentos, los LB normales de SP se obtuvieron de bolsas de concentrado sanguíneo de donantes sanos (*buffy coats*) solicitadas al Centro Nacional de Transfusiones (Madrid). Las células mononucleares (PBMC, del inglés “*peripheral blood mononuclear cells*”) se separaron mediante centrifugación en gradiente de densidad y, a continuación, se aislaron las células B por selección positiva inmunomagnética. Brevemente, las células fueron marcadas con Acs monoclonales anti-CD19 conjugados con ficoeritrina (PE, del inglés “*phycoerithrin*”), incubadas con microesferas anti-PE y aisladas en un separador automático (auto-MACS SeparatorTM Miltenyi Biotec GmbH) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras separación celular automática, la pureza de las células B aisladas fue mayor del 97% analizadas por citometría de flujo (CMF).

Las células fueron utilizadas inmediatamente o cultivadas durante 6 a 12 horas a 37°C en medio de cultivo RPMI-1640 (Life Technologies) suplementado con 50 µg/mL penicilina/estreptomicina, glutamina 2 mM, y 10% de suero fetal bovino (FCS, del inglés “*fetal calf serum*”) para evitar una eventual internalización de los CKR inducida por la interacción *in vivo* con sus correspondientes ligandos.

2. CITOMETRÍA DE FLUJO

Previamente a cualquier experimento, se realizó una caracterización inmunofenotípica inicial de las neoplasias de células B mediante CMF con Acs monoclonales dirigidos frente a los siguientes Ags de superficie humanos: CD45, CD19, cadena ligera kappa y lambda, CD20, CD23, CD5, CD34, CD10, FMC7, CD22, CD11c, CD103, CD38, CD56 y CD138 (todos de Becton Dickinson). El Ac murino anti-CXCR4 humano conjugado con PE fue obtenido de Pharmingen. Los Acs murinos anti-CCR7 y anti-CXCR5 humanos conjugados con PE se obtuvieron de R&D Systems. En todos los casos se utilizaron los controles de isotipo apropiados.

Para el marcaje, 100 µl de muestras de SP completa o MO se incubaron durante 30 minutos a 4°C con concentraciones óptimas (1-3 µg/mL) de los Acs apropiados en cada caso. A continuación, se procedió a la lisis de las células rojas sanguíneas mediante incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución lisante comercial de Becton Dickinson siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras el lavado de las células con PBS (del inglés “*phosphate-buffered saline*”), se resuspendieron las células en 500 µL de PBS frío. En las muestras de amígdala y GL, se marcaron 10⁶ células resuspendidas en 100 µL de PBS como se ha mencionado, pero sin el paso de lisis.

El análisis se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD). La adquisición de los datos y el análisis se realizó utilizando el software CellQuestPro (BD). En todos los experimentos, se adquirió un mínimo de 5000 células B neoplásicas. En los estudios de expresión de CKR, se analizó dicha expresión en las células B tumorales seleccionadas electrónicamente con CellQuestPro. Los resultados se representan como la media de intensidad de fluorescencia (MIF) para un CKR dado dentro de la población de interés.

3. QUIMIOQUINAS, ANTICUERPOS E INHIBIDORES

Las quimioquinas CXCL12/SDF-1 α , CCL19/MIP-3 β , CCL21/6Ckine, CXCL13/BCA-1 y CCL5/RANTES recombinantes humanas se obtuvieron de R&D Systems en una primera fase del trabajo y, posteriormente, en el estudio de las vías de señalización inducidas por CCR7, CCL19 y CCL21 se obtuvieron de PeproTech.

El Ac monoclonal purificado de ratón bloqueante anti-CCR7 humano (clon 150503) se obtuvo de R&D Systems. Los Acs frente a fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), fosfo-p38SAPK (Thr180/Tyr182) (28B10), fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9), p38SAPK (L53F8), SAPK/JNK y fosfo-Akt (Ser473) se consiguieron de Cell Signaling Technology. El Ac anti-ERK-2 (C-14) fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Los inhibidores SP600125, SB203580, PD98049, wortmanina y LY294002, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. U0126, Y-27632 y PTX se adquirieron de Calbiochem.

4. ENSAYO DE QUIMIOTAXIS *IN VITRO*

Los experimentos de quimiotaxis *in vitro* se realizaron con las células mononucleares de muestras de SP o MO de LLC-B, MM, LAL-B y PPBL, o con células B normales obtenidas de *buffy coats* y aisladas como se ha indicado previamente. En el caso de LLC-B y MM, se eligieron aquellas muestras en las que las células malignas se encontraban en una proporción mayor del 80 y 60%, respectivamente, de las células mononucleares aisladas, y no se realizó una mayor separación de las células B tumorales. En algunos casos, las células se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Las células congeladas fueron reconstituidas en RPMI-1640 suplementado con 2% FCS, L-glutamina 2 mM, y 50 µg/mL de penicilina/estreptomicina, y se permitió su recuperación a 37°C en atmósfera de 5% CO₂ durante 3 horas antes de realizar el ensayo. Cuando fue necesario, las células B normales o las células de LLC-B se pretrataron con los inhibidores en estudio durante 1 hora a 37°C a las concentraciones finales indicadas en las leyendas de las figuras, y estuvieron también presentes durante el ensayo de quimiotaxis. Ninguno de los inhibidores utilizados afectó a la expresión de CCR7 en la superficie celular o la viabilidad celular (datos no mostrados).

La quimiotaxis se determinó por duplicado en cámaras de cultivo celular *Transwell* (diámetro 6,5 mm; espesor 10 µm, tamaño del diámetro de poro 5 µm, Costar). Se añadieron un total de 5×10^5 células, resuspendidas en 100 µL de RPMI-1640+0,5% albúmina sérica humana, a la cámara superior, y las quimioquinas a la cámara inferior en 600 µL del mismo medio a la concentración óptima (100 ng/mL para CXCL12, 1 µg/mL para CCL19 y CCL21, 2 µg/mL para CXCL13 y 10 ng/mL para CCL5). La migración tuvo lugar durante 4-6 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Las células que migraron fueron recogidas de la cámara inferior, marcadas con Acs monoclonales anti-CD19 o, en el caso de células de MM, con anti-CD38, y contadas por CMF durante 60 segundos tras calibrar la tasa de flujo con tubos Trucount (BD Biosciences). Se analizó el número de eventos dentro de la población seleccionada electrónicamente de células B, normales o patológicas. Los resultados se expresan como porcentaje de células que han migrado respecto al número de células contadas en la suspensión celular inicial (% de células: $100 \times \text{número de células migradas} / \text{número de células contadas en la suspensión inicial}$), o como índice de migración ($\text{número de células CD19}^+ \text{ o CD38}^+ \text{ que han migrado en presencia de la quimioquina} / \text{número de células CD19}^+ \text{ o CD38}^+ \text{ que migran en ausencia de quimioquina}$).

5. ENSAYO DE POLIMERIZACIÓN DE ACTINA

PMBC de pacientes de LLC-B se marcaron previamente con Acs anti-CD19 para determinar específicamente la polimerización de actina en las células patológicas. Se incubaron 5×10^5 células en 100 μ L de RPMI-1640 a 37°C con las quimioquinas (100 ng/mL para CXCL12, 1 μ g/mL para CCL19 y CCL21 y 10 ng/mL para CCL5) durante diferentes períodos de tiempo o con concentraciones crecientes de CCL19 durante 15 segundos. A continuación, se fijaron y permeabilizaron las células utilizando el kit *Fix and Perm*TM (Caltag Laboratories) para la detección de Acs intracelulares, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células fueron marcadas con 5 μ g/mL de faloidina-Alexa 488 (Molecular Probes) y analizadas por CMF. Los resultados se expresan como el porcentaje de actina F intracelular relativo al valor encontrado en células no tratadas (t=0).

6. ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN DEL RECEPTOR

Para estudiar la disminución de la expresión de los CKR por unión a sus ligandos, se utilizaron las células mononucleares de muestras de SP de LLC-B, la línea celular T Jurkat o una línea celular pre-B murina transfectada con CCR7 humano (hCCR7 300-19). 5×10^5 células en 100 μ L de RPMI-1640+0,1% albúmina sérica humana fueron incubadas a 37°C con varias concentraciones de CCL19, CCL21 y CXCL12 y durante distintos períodos de tiempo (desde 1 minuto hasta 1 hora) a 37°C en atmósfera de 5% CO₂ o con concentraciones crecientes de CCL19 durante 1 hora a 37°C. Tras lavar las células en PBS frío, se determinó la expresión de CCR7 o CXCR4 en las células mediante análisis por CMF como se ha indicado anteriormente.

7. ESTUDIO DEL ESTADO MUTACIONAL DE LOS GENES IgVH

Se aislaron los PBMC de 25 pacientes de LLC-B y se purificó el ADN genómico utilizando un método estándar basado en el uso de la proteinasa K. Se estudió el reordenamiento de los genes IgV_H mediante una reacción en cadena de la polimerasa semi-anidada (*nested* PCR). Brevemente, en una primera ronda de PCR, se amplificaron 500 ng de ADN genómico utilizando 6 cebadores específicos de familia para la región marco 1 de V_H (V_H FR1) y un cebador consenso para el gen J_H. Estas reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ L con MasterMix 1x (Promega) y con cada cebador a una concentración de 1 μ M. Las condiciones de PCR consistieron en un ciclo de 1 min a 95°C, 2 min a 59°C, y 40 s a 72°C, seguido de 34 ciclos a 95°C durante 45 s, 15 s a 59°C, y 40 s a 72°C, más un ciclo final de 10 min a 72°C. La PCR semi-anidada se realizó con los mismos 6 cebadores V_H FR1 y un cebador interno del gen J_H, 5 μ L del producto de PCR de la primera ronda, y la misma concentración de reactivos. Las condiciones de la segunda PCR fueron 45 s a 95°C, temperatura de hibridación de 61°C para los cebadores V_H1, V_H2, y V_H6, y 65°C para V_H3, V_H4, y V_H5, y 72°C durante 40 s. Tras 25 ciclos, se continuó la extensión durante 10 min adicionales. Una

alícuota de 10 µL del producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 2% marcado con bromuro de etidio.

Los productos de PCR fueron secuenciados directamente con los mismos cebadores utilizados en la amplificación tras purificación con el kit Spin-X (Costar), utilizando un secuenciador de ADN automático ABI PRISM 3700 (Applied Biosystem), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias se compararon con la secuencia de la línea germinal obtenida de los directorios de secuencias IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) y VBASE (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase>). Las secuencias de los genes IgV_H reordenados se consideraron mutadas cuando presentaron más de un 2% de diferencias con la secuencia de la línea germinal IgV_H.

8. ENSAYO DE WESTERN BLOT

Para determinar las formas totales y fosforiladas de MAPKs, las células de LLC-B pretratadas, en un medio libre de suero, con los inhibidores en estudio durante 1 hora a 37°C o no tratadas, se estimularon con 1 µg/mL de CCL19 o CCL21 durante los períodos de tiempo indicados a 37°C. Se descartaron las muestras con menos de un 90% de células de LLC-B en la población mononuclear. Tras centrifugación y lavado a 4°C, se lisaron las células en volúmenes iguales de *buffer* RIPA frío [10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,1% SDS, 0,5% desoxicolato sódico, 1 mM ortovanadato sódico, 1 mM EGTA, 10 mM pirofosfato sódico, 100 mM fluoruro sódico, 1 mM fluoruro de fenil-metil-sulfonilo y un cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete protease inhibitor cocktail tablets* de Roche Diagnostics)]. Se hirvieron los sobrenadantes resultantes de la centrifugación de los lisados durante 5 minutos en *buffer* Laemmli 4x antes de resolución por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE). Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). La membrana fue bloqueada en TBS (del inglés “*Tris-buffered saline*”) conteniendo 0,1% Tween-20 y 5% de leche desnatada en polvo, y seguidamente incubada con el Ac primario apropiado durante toda la noche a 4°C en TBS más 2% de leche en polvo. Tras lavado con TBS suplementado con 0,1% Tween-20 para minimizar las uniones inespecíficas, las membranas se incubaron con un Ac secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante disuelto en TBS-Tween anti-Ig de conejo o de ratón (Pierce), dependiendo de la procedencia del Ac primario utilizado, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras efectuar diversos lavados de la membrana con TBS-Tween, las proteínas se visualizaron finalmente usando el kit ECL de quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotech) o una solución SuperSignalTM (Pierce). La detección de las proteínas se realizó con el analizador de imágenes LAS1000 (FujiFilm) y el software Image Gauge. Las valoraciones densitométricas de cada proteína se determinaron con el software Image Reader. Para poder reutilizar la membrana y rehibridarla con otro Ac primario, se trataron las membranas con un tampón de *stripping* conteniendo 200 mM glicina, 500 mM NaCl y con un pH de 2,8.

9. NUCLEOFECCIONES

Los plásmidos codificantes de la forma dominante negativa ($\Delta p85\alpha$ -GFP) y del mutante constitutivamente activo de PI3K (pCDNA3-p110CAAX), previamente descritos (**Vicente-Manzanares *et al.*, 1999**), fueron amablemente cedidos por el Dr. Sánchez Madrid (Hospital Universitario de La Princesa, Madrid). El vector de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés “*green fluorescent protein*”) (pEGFP-C1) se obtuvo de Clontech.

La nucleofección de las células LLC-B frescas, obtenidas de muestras de SP, se realizó utilizando el programa U15 del kit de nucleofección de células B humanas de Amaxa, siguiendo las instrucciones del fabricante. 15×10^6 células LLC-B se nucleofectaron con 5 μ g del plásmido $\Delta p85\alpha$ -GFP o únicamente con GFP como control. En el caso de p110 α CAAX, las células se nucleofectaron con 5 μ g del plásmido junto con 1 μ g de GFP. Para estudiar la calidad inicial del cultivo celular y la posible influencia de la nucleofección en la viabilidad celular, se resuspendieron 15×10^6 células en la solución de nucleofección sin ADN y fueron nucleofectadas con el programa U15 (Mock).

Las células nucleotransfectadas se incubaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% FCS, 50 μ g/mL penicilina/estreptomicina y 2 mM L-glutamina a 37°C en atmósfera con 5% CO₂. Dieciséis horas después de la nucleofección, se realizó el ensayo de quimiotaxis en respuesta a CCL19 en cámaras *Transwell* en un medio libre de suero durante 4 horas, como se indica anteriormente. Sólo se consideraron para análisis los linfocitos CD19+GFP+.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó el software SPSS (versión 10). En el estudio de la expresión de CKR, la normalidad de la distribución de las variables dependientes se testó utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Para que los datos correspondieran a una distribución normal, se realizó una transformación de logaritmo neperiano a los valores de MIF. Para detectar diferencias entre los valores de MIF de los distintos grupos, se utilizó el test de ANOVA. Se realizaron comparaciones múltiples con el test *post-hoc* de Scheffé. Todas las comparaciones se hicieron como un test de dos colas. Los datos se expresan como medianas y rangos intercuartílicos de la variable original. El test de Mann-Whitney se realizó para comparar los índices de migración y la MIF de los CKR en relación con la presencia de linfadenopatías, el estado mutacional del gen IgV_H y la expresión de CD38. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

En los ensayos de migración en presencia de inhibidores de distintas vías de señalización, los resultados se expresan como la media aritmética \pm el error estándar de la media (EEM). Se utilizó el análisis de la varianza ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Dunnett para comparar la migración de las células tratadas con los diferentes inhibidores, tomando el grupo estimulado con las

quimioquinas y sin pretratamiento con inhibidores como categoría control. De la misma forma, se utilizó el ANOVA para estudiar el efecto de la transfección de dos mutantes de PI3K en la migración de células LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7, utilizando las células nucleotransfectadas sin ADN (Mock) como categoría control en el test *post-hoc* de Dunnett. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$ en todos los casos.

4-RESULTADOS

1. ESTUDIAR LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS DE NEOPLASIAS DE CÉLULAS B PARA PROFUNDIZAR EN EL CONOCIMIENTO DE SUS PATRONES DE MIGRACIÓN Y METASTATIZACIÓN

1.1. La LLC-B y los LNH-B caracterizados por una amplia diseminación ganglionar expresan altos niveles de los receptores de las principales quimioquinas homeostáticas: CCR7, CXCR4 y CXCR5

La presentación clínica de las distintas neoplasias de células B muestra una gran variabilidad (Evans y Hancock, 2003; Fernández-Rañada de la Gándara y Alegre Amor, 2005). Patologías como la leucemia linfática crónica-B (LLC-B), por ejemplo, presentan una amplia diseminación de las células tumorales en GL, MO y SP, mientras otras patologías, como por ejemplo, el mieloma múltiple (MM) o la tricoleucemia (HCL), están confinadas a un número limitado de órganos, con un mínimo o nulo compromiso de los GL.

Pero en el momento en el que se inició este trabajo, no se conocía mucho acerca de los mecanismos que pueden estar determinando esta heterogeneidad en los patrones migratorios de las neoplasias linfoides, aunque algunas evidencias suponían un papel de las quimioquinas homeostáticas y de sus receptores. Además, en concreto, ningún estudio había mostrado la contribución del receptor CCR7, fundamental en el proceso de extravasación linfocitaria a OLS, al patrón diferencial de diseminación a GL que caracteriza los diferentes LNH-B. Por todo ello, decidimos estudiar la expresión de CCR7 en diferentes patologías de células B, abarcando tumores procedentes de distintos estadios de diferenciación, desde la leucemia aguda linfoblástica-B (LAL-B) hasta el MM. Simultáneamente, se analizó la expresión de CXCR4 y CXCR5, debido a su contribución a la entrada de los LB en tejidos linfoides secundarios y a su papel en la organización funcional de los linfocitos en el interior de estos órganos.

Antes de comenzar el estudio, elaboramos una serie de hipótesis. Había que tener en cuenta que la expresión de los CKR podía ser el resultado del proceso de transformación oncogénica, y ser una expresión aberrante, pero también podía ser una característica derivada de su supuesta célula de origen. Asumiendo esto último, el trabajo partió de los siguientes supuestos:

- Aquellas neoplasias derivadas de células en un estadio de linfocito *naïve*, como el linfoma del manto (MCL), presentarían una expresión elevada tanto de CCR7, como de CXCR5.
- Aquellas leucemias o linfomas correspondientes a un estadio de CG, como el linfoma folicular (FL), presentarían una expresión menor de CCR7 y niveles elevados de CXCR5.

- Aquellas patologías correspondientes a un estadio de diferenciación posgerminal expresarían bajos niveles de ambos receptores.
- En el caso de otras patologías con un origen discutido, como la LLC-B, no podíamos predecir la expresión de dichos receptores.
- En neoplasias de células inmaduras, como la LAL-B, tampoco podíamos predecirlo ya que se desconocía el patrón de expresión de CKR en células B precursoras normales.

Analizamos la expresión de los receptores por CMF en las células malignas (**Figura 9 y Tabla 5**). De acuerdo con las hipótesis indicadas, encontramos que el MCL, correspondiente con un estadio de diferenciación *naïve*, presentaba una alta expresión de CCR7. El FL, originado a partir de linfocitos ya estimulados por el Ag, seguía expresando niveles significativos de CCR7, aunque menores que en el caso anterior. Las patologías posgerminales [linfomas de la zona marginal (MZL), MM, HCL, linfoma linfoplasmacítico (LPL)], correspondientes a los últimos estadios de diferenciación, expresaban bajos o nulos niveles del receptor. Podemos comprobar cómo, en general, la expresión de CCR7 es menor, cuanto mayor es el estadio de diferenciación de las supuestas células de origen de las patologías, a excepción de la leucemia de precursores B (LAL-B), que al igual que la linfocitosis persistente policlonal de células B (PPBL), apenas presenta expresión de la molécula. Por otro lado, la patología que presentó mayores niveles de expresión de CCR7 fue la LLC típica de células B CD5+, con niveles significativamente mayores que los linfocitos normales de SP. En la LLC-B atípica CD5- existe una alta expresión de CCR7, pero significativamente menor que la encontrada en la LLC-B típica.

De forma similar a CCR7, los niveles de CXCR5 fueron muy bajos o indetectables en LAL-B (datos no mostrados), y se observó igualmente una correlación inversa en sus niveles de expresión respecto al estadio de diferenciación de tumores de células B maduras, con niveles altos en neoplasias con fenotipo *naïve* y niveles bajos o negativos en neoplasias posgerminales como la HCL o el MM. Al igual que en el caso de CCR7, la patología que presentó un mayor nivel de expresión del receptor fue la LLC-B y, en menor medida, el MCL (**Tabla 5**).

Prácticamente, todas las células de las neoplasias B analizadas fueron positivas para CXCR4. Sin embargo, el nivel de expresión de este receptor fue muy variable dentro de la misma patología y entre las diferentes enfermedades. Sólo la HCL, el linfoma esplénico de la zona marginal (SMZL) (**Tabla 5**) y la PPBL (datos no mostrados) expresaron, de manera uniforme, bajos niveles de CXCR4.

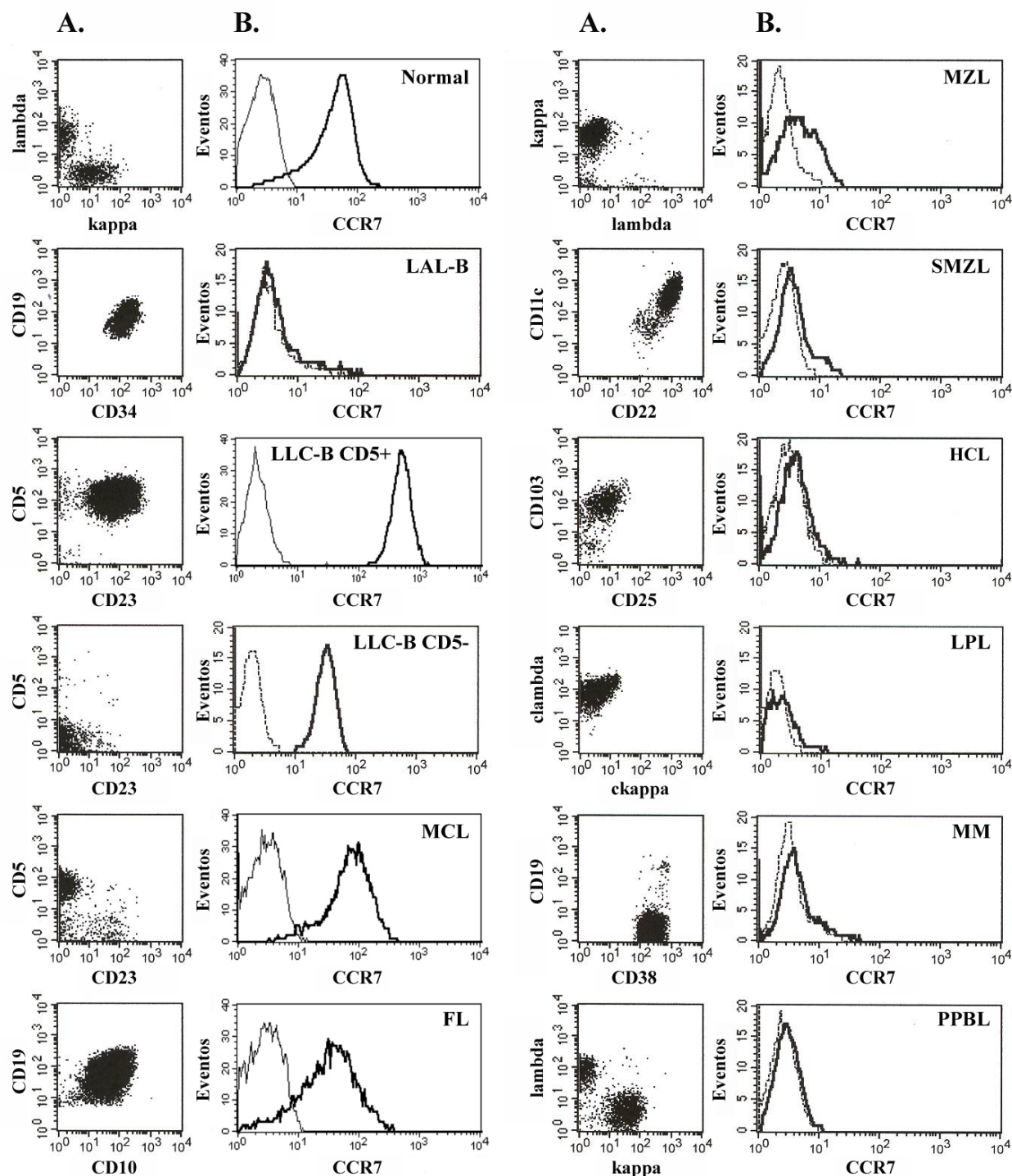


Figura 9. Expresión de CCR7 en diferentes leucemias y LNH de células B. La expresión de superficie de CCR7 fue analizada por CMF en las células patológicas. **A.** Se seleccionaron las poblaciones neoplásicas mediante la expresión de marcadores de superficie característicos de cada patología. A continuación, se analizó en dichas poblaciones la expresión de CCR7 en **B.** *Líneas gruesas:* Expresión de superficie de CCR7 en las células patológicas. *Líneas finas:* Marcaje con un Ac control. Se muestra un caso representativo de cada patología estudiada. **Abreviaturas:** **Normal:** LB normales de SP; **LAL-B:** Leucemia aguda linfoblástica de células B; **LLC-B CD5+** y **CD5-:** Leucemia Linfática Crónica de células B típica CD5+ y atípica CD5-; **MCL:** linfoma del manto; **FL:** linfoma folicular; **MZL:** linfoma de la zona marginal; **SMZL:** linfoma esplénico de la zona marginal; **HCL:** tricoleucemia; **LPL:** linfoma linfoplasmacítico; **MM:** mieloma múltiple; **PPBL:** linfocitosis persistente policlonal de células B; **ckappa:** cadena kappa citoplasmática; **clambda:** cadena lambda citoplasmática.

	CCR7	CXCR4	CXCR5
Leucemia linfática crónica B (n= 91)	301 (176; 577)	410 (248; 631)	474 (279; 838)
Linfoma del manto (n= 15)	100 (53; 143)	173 (118; 289)	229 (77; 470)
Linfoma folicular (n= 16)	47 (42; 117)	215 (82; 930)	98 (65; 381)
Linfoma esplénico de la zona marginal (n= 8)	19 (7; 24)	17 (17; 50)	49 (7; 80)
Tricoleucemia (n= 9)	32 (21; 47)	36 (29; 62)	19 (14; 34)
Mieloma múltiple (n= 30)	11 (6; 22)	54 (26; 127)	17 (8; 24)
	p=0,086*	p=0,025	p=0,076**

Tabla 5. La expresión de CCR7, CXCR4 y CXCR5 es significativamente mayor en neoplasias B con diseminación ganglionar que en aquellas con mínimas linfadenopatías. Comparación de la expresión de CKR, utilizando el test post-hoc de Scheffé, entre neoplasias de células B con diseminación ganglionar y aquellas neoplasias donde no se produce, o en bajo grado, un compromiso de los GL. Se representa la mediana y el rango intercuartílico de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de CCR7, CXCR4 y CXCR5 para cada una de las patologías. *p resultó mayor de 0,05 debido a que la MIF de CCR7 en el linfoma folicular no fue estadísticamente mayor que la de las células de tricoleucemia. **p resultó mayor de 0,05 ya que la MIF de CXCR5 de las células de linfoma folicular no fue estadísticamente mayor que la MIF del linfoma esplénico de la zona marginal.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de los CKR en una patología dada cuando se consideraron distintas fuentes (SP, MO o biopsias de GL) (datos no mostrados).

Pero la principal conclusión de estos datos es que aquellas neoplasias de células B caracterizadas por una amplia diseminación ganglionar, incluyendo la LLC-B, el MCL y el FL, mostraron mayores niveles de los principales receptores implicados en la entrada de células B en tejidos linfoides secundarios (CCR7, CXCR4 y CXCR5), que aquellas patologías con mínima o nula presencia de linfadenopatías, como los MZL, la HCL y el MM, las cuales presentan una expresión baja o nula de CCR7 y CXCR5, y niveles bajos a moderados de CXCR4 (Tablas 5 y 6).

Patología	Expresión CCR7/CXCR5	Infiltración de ganglios linfáticos
Leucemia linfática crónica B	ALTA/ALTA	GENERALIZADA
Linfoma del manto	ALTA/ALTA	GENERALIZADA
Linfoma esplénico de la zona marginal	NEGATIVA/BAJA	BAJA
Tricoleucemia	NEGATIVA/BAJA	BAJA
Mieloma múltiple	NEGATIVA/BAJA	BAJA a NULA

Tabla 6. Relación entre la expresión de superficie de los receptores CCR7 y CXCR5 analizados por CMF y el nivel de infiltración de los GL característicos de cada patología.

2. ESTUDIAR SI EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS DE UNA NEOPLASIA B ES SIMILAR AL DE SU EQUIVALENTE CELULAR NORMAL O ES EL RESULTADO DE UNA TRANSFORMACIÓN NEOPLÁSICA

2.1. El patrón de expresión de receptores de quimioquinas de una neoplasia B refleja el de su célula normal de origen

A continuación, nos planteamos, como se comentó anteriormente, verificar si el patrón de expresión de CKR de una neoplasia B es similar al de su equivalente celular normal o si es el resultado de un proceso de transformación neoplásica.

Para comprobar esta posible relación entre las neoplasias B y las células B normales fenotípicamente relacionadas, analizamos la expresión de los CKR en diferentes subpoblaciones de células B obtenidas de SP, MO y amígdala (**Figuras 10-11 y Tabla 7**). Al igual que la intensidad de la expresión de CCR7 en células CD5+ malignas, procedentes de LLC-B y MCL, fue mayor que en patologías CD5-, encontramos que las células B CD5+ normales de SP y amígdala expresaron, de manera consistente, mayores niveles de CCR7 que el resto de los LB. De todas formas, la expresión de CCR7 en LLC-B y MCL fue incluso más intensa que la de los LB normales CD5+ [301(176,577) y 100(53,143) vs 68(51,72), respectivamente; media de la MIF (rango intercuartílico)].

La expresión de CXCR4 y CXCR5 fue ligeramente mayor en células B CD5+ normales que en la población global de células B. Al igual que en el caso de CCR7, la mayoría de las muestras de LLC-B sobreexpresaron CXCR4 y CXCR5 con una MIF dos y cuatro veces mayor, respectivamente, que la de los LB CD5+ normales [410(248,631) vs 230(193,415) para CXCR4 y 474(279,838) vs 123(101,143) para CXCR5].

Las células B CD10+CD38+ de CG, las cuales se postula que son las células normales de origen del FL CD10+, expresaron de manera uniforme menos CCR7 que la población global de células B. De forma similar a las neoplasias B CD5+, las células de FL CD10+ expresaron niveles significativamente mayores de CCR7 que las células B normales derivadas de CG CD10+CD38+ [47(42,117) vs 21(16,22)]. La MIF de CXCR4 y CXCR5 de células B de CG fue mayor que la del resto de los linfocitos B. En el caso del MCL y el FL, la intensidad de expresión de CXCR4 y CXCR5 presentó una notable variabilidad, con un rango de intensidad media de fluorescencia que incluye la de sus LB normales relacionados.

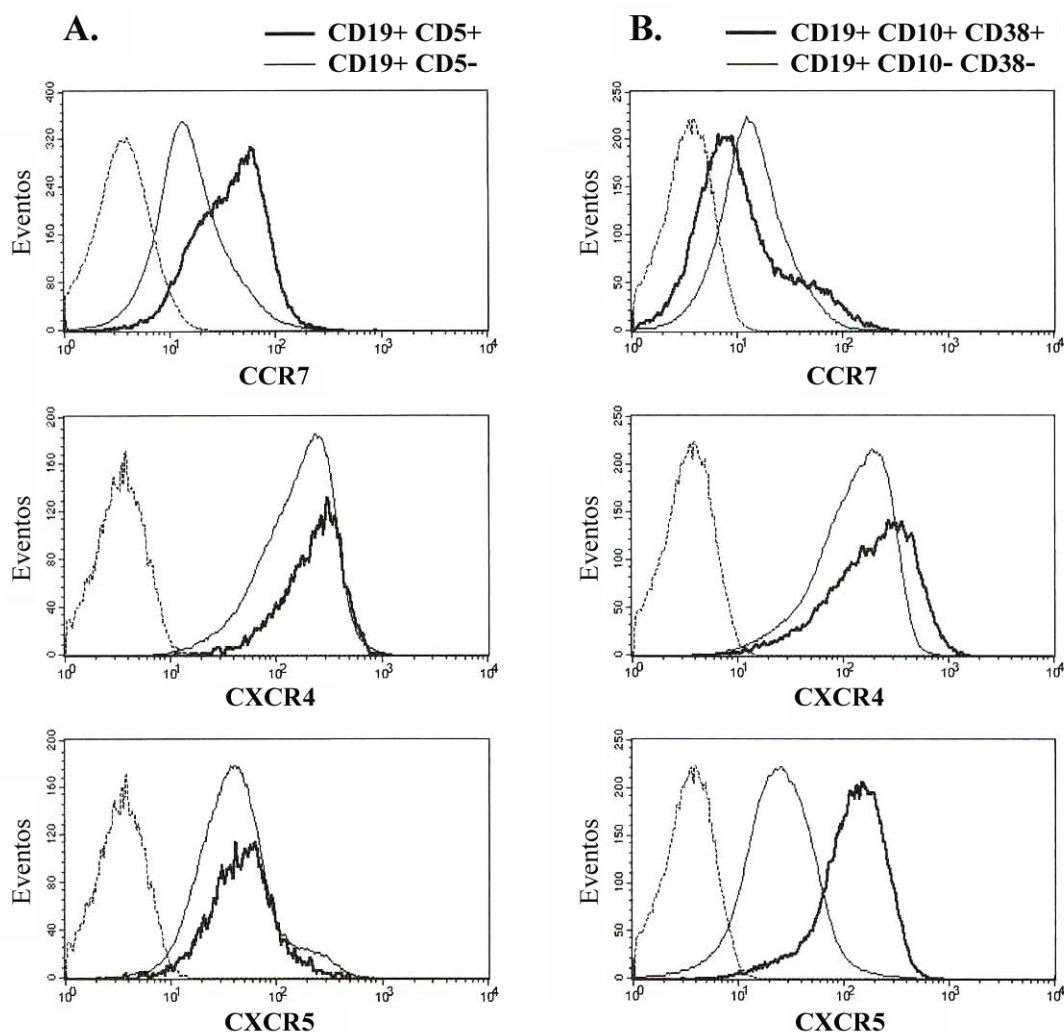


Figura 10. Expresión de los receptores CCR7, CXCR4 y CXCR5 en subpoblaciones normales de células B obtenidas de amígdala. **A.** Expresión de los CKR en linfocitos CD19+CD5+ (líneas gruesas) y células CD19+CD5- (líneas finas) analizado por CMF. **B.** Expresión de CKR en linfocitos CD19+CD10+CD38+ derivados de CG (líneas gruesas) y en el resto de las células B (líneas finas). Las líneas intermitentes corresponden al marcaje con un Ac control. En ambos casos se muestra un experimento representativo de un total de cinco.

	CCR7	CXCR4	CXCR5
Células B CD5+	68 (51; 72)	230 (193;415)	123 (101; 143)
Células B CD10+	21 (16; 22)	322 (204; 485)	210 (99; 312)
Población B global	29 (28; 30)	191 (92; 276)	98 (72; 125)

Tabla 7. Expresión de CCR7, CXCR4 y CXCR5 en diferentes subpoblaciones de células B normales obtenidas de amígdala. Se representa la mediana y el rango intercuartílico de las MIF de los tres receptores estudiados para cada subpoblación de células de un total de cinco experimentos independientes.

De la misma forma, analizamos la expresión de los CKR en precursores normales de células B y en células plasmáticas y, al igual que los blastos LAL-B y las células mielomatosas, respectivamente, presentaron niveles muy bajos o negativos de CCR7 (**Figura 11**) y CXCR5, y niveles de expresión moderados de CXCR4 (datos no mostrados).

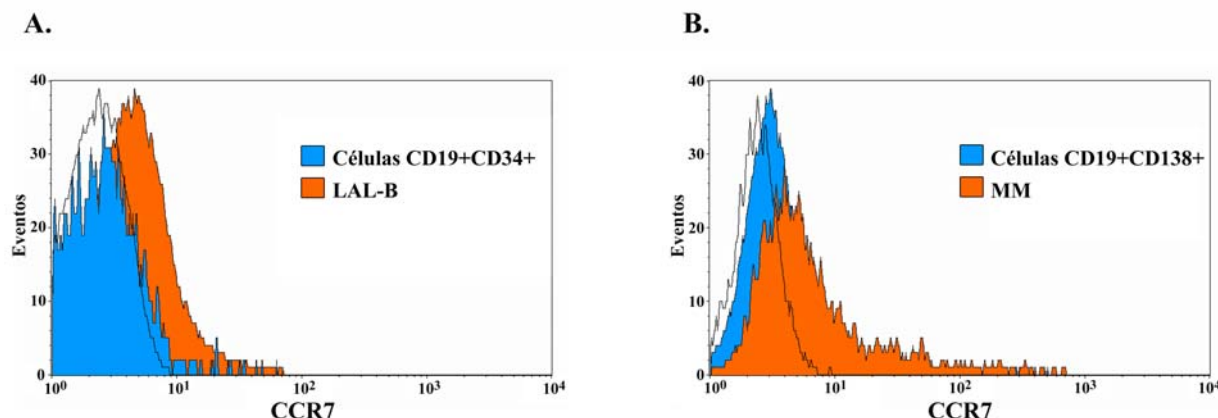


Figura 11. Expresión de CCR7 en precursores B, células plasmáticas y las correspondientes células leucémicas. Se obtuvieron las diferentes subpoblaciones celulares de muestras de MO de donantes sanos o pacientes con leucemia aguda linfoblástica B (LAL-B) o mieloma múltiple (MM) y se analizó la expresión de superficie de CCR7 por CMF. **A.** Expresión de CCR7 en precursores B normales CD19+CD34+ (azul) y células patológicas de LAL-B (naranja). **B.** Análisis de la expresión en células plasmáticas normales CD19+CD138+ (azul) y células mielomatosas (naranja). En ambos casos se realizó un marcaje con un Ac control (blanco). Se muestra un experimento representativo de un total de cinco.

Por tanto, parece que la expresión de CKR por parte de las células tumorales refleja la expresión de dichos receptores en sus supuestos equivalentes celulares normales, aunque después dicha expresión pueda aumentar por otros procesos que tengan lugar en el tumor.

3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL RECEPTOR DE QUIMIOQUINAS CCR7

3.1. El patrón de quimiotaxis de diferentes poblaciones de células B está relacionado con los niveles de expresión de receptores de quimioquinas

Los datos de expresión evidenciaban un papel de CCR7, CXCR4 y CXCR5 en la determinación del patrón de diseminación a órganos linfoides de los desórdenes linfoproliferativos B. Por tanto, a continuación realizamos una primera caracterización funcional de dichos receptores. Analizamos si el patrón quimiotáctico *in vitro* de diferentes poblaciones de células B, incluyendo LLC-B, LAL-B, MM, PPBL y células B normales de SP, estaba relacionado con sus niveles de expresión de CKR.

Se analizó la quimiotaxis *in vitro* en cámaras Transwell en respuesta a los ligandos de CCR7 (CCL19/MIP-3 β y CCL21/6C-kine), CXCR4 (CXCL12/SDF-1 α) y CXCR5 (CXCL13/ BCA-1).

Como control negativo se utilizó CCL5/RANTES, una quimioquina inflamatoria que se une a los receptores CCR1, CCR3 y CCR5.

Mediante experimentos dosis-respuesta determinamos las concentraciones de quimioquina óptimas para LLC-B: 1 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de CCL19 y CCL21, 2 $\mu\text{g/mL}$ para CXCL13 (**Figura 12**) y 100 ng/mL para CXCL12 (datos no mostrados). Los mismos resultados se obtuvieron para células normales de SP (datos no mostrados).

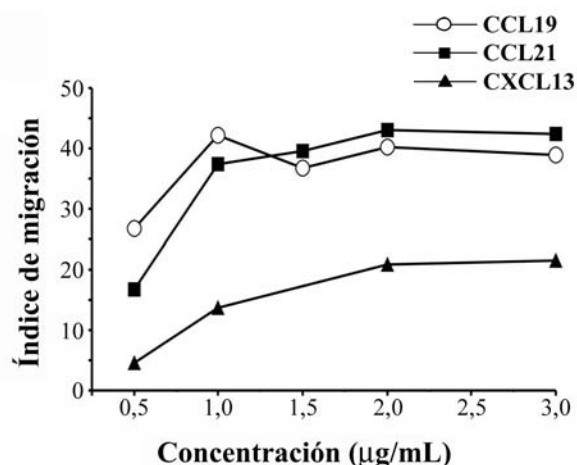


Figura 12. Respuesta quimiotáctica *in vitro* de células de LLC-B a diferentes concentraciones de CCL19, CCL21 y CXCL13. Se analizó la migración celular en cámaras *Transwell* durante 4 horas a 37°C como se describe en Materiales y Métodos. Se representa el índice de migración (número de células LLC-B que migran en presencia de la quimioquina dividido por el número de células LLC-B que migran en ausencia de la quimioquina) de un caso representativo de un total de tres.

En el caso de la LLC-B, la sobreexpresión de CCR7, CXCR4 y CXCR5 podía explicar la amplia diseminación a órganos linfoides que caracteriza esta patología, y observamos que las células leucémicas migraban eficientemente en respuesta a las cuatro quimioquinas en estudio (**Figura 13**). Como se ha comentado, dentro de la LLC-B existe una gran heterogeneidad a múltiples niveles: características moleculares, clínicas, tiempo de supervivencia, etc., e incluso en cuanto al origen de las células. Igualmente, se observó una gran variabilidad en la capacidad quimiotáctica *in vitro* entre los distintos donantes. El porcentaje de células que migraron fue $31,6\% \pm 20,2$ (media \pm desviación estándar) y $29,6\% \pm 19,7$ en respuesta a CCL19 y CCL21, respectivamente. En general, los índices de migración obtenidos fueron muy elevados, ya que la migración basal de las células LLC-B fue prácticamente nula. En ausencia de sustancias quimioatrayentes, el porcentaje de células migradas fue del $1,0\% \pm 0,8$. Como puede observarse, la eficacia quimiotáctica de ambas quimioquinas fue similar en la mayoría de los casos. Por otra parte, la quimiotaxis *in vitro* de las células LLC-B inducida por CXCL12 y CXCL13 fue usualmente menor que la mediada por CCL19 y CCL21. Como control negativo, CCL5 no indujo la migración de células de LLC-B en ninguno de los experimentos realizados.

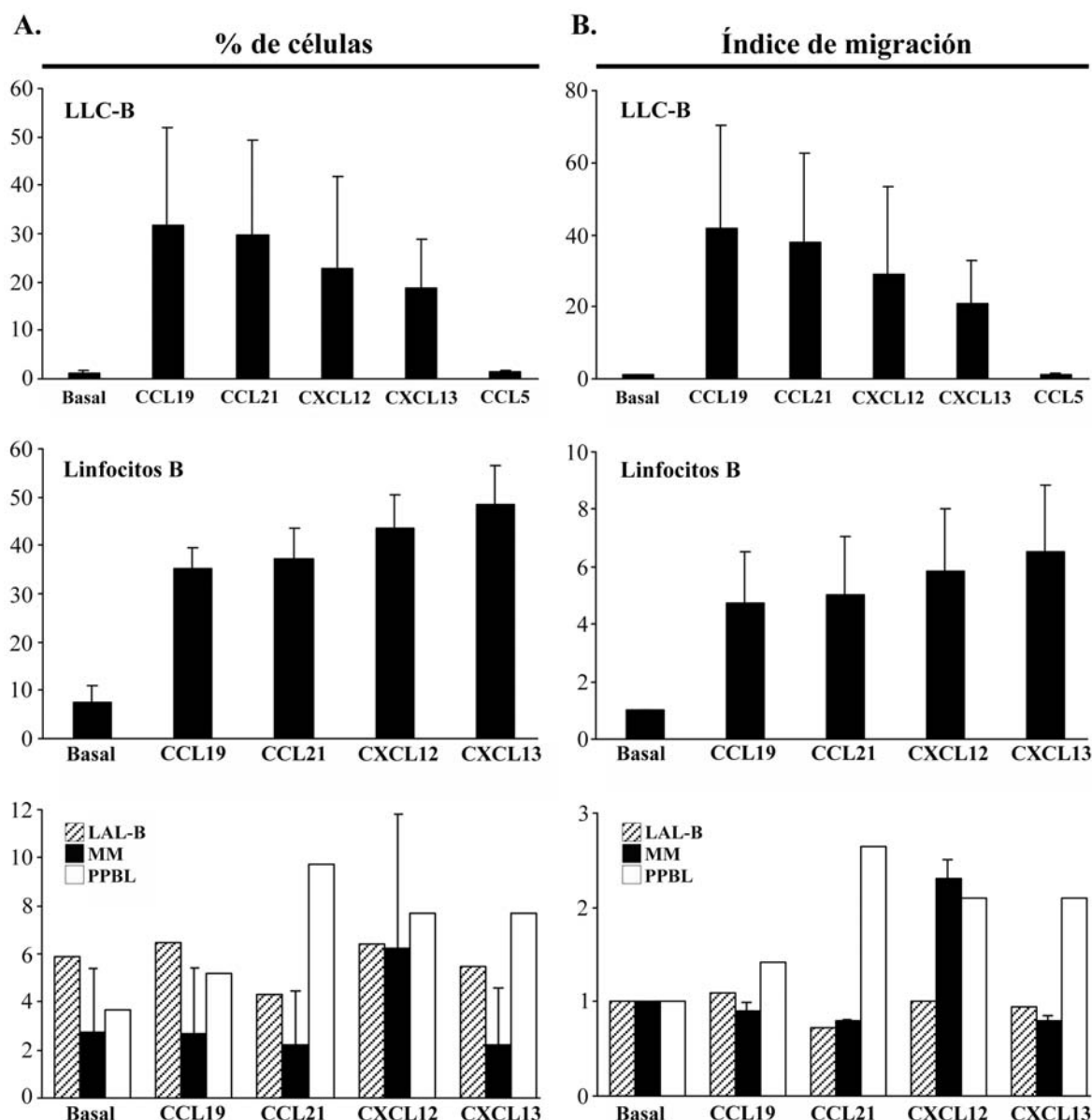


Figura 13. El patrón de quimiotaxis a los ligandos de CCR7, CXCR5 y CXCR4 de diferentes subpoblaciones linfoides correlaciona con la expresión de dichos receptores. Se analizó la quimiotaxis celular *in vitro* en cámaras *Transwell*, como se describe en Materiales y Métodos, en respuesta a las siguientes quimioquinas: CCL19 y CCL21 (1 $\mu\text{g/mL}$), CXCL12 (100 ng/mL), CXCL13 (2 $\mu\text{g/mL}$) y CCL5 (10 ng/mL). Se presentan los resultados de células de leucemia linfática crónica-B (LLC-B; $n=25$), linfocitos B normales de SP ($n=4$), leucemia aguda linfoblástica-B (LAL-B; caso representativo), mieloma múltiple (MM; $n=4$) y linfocitosis policlonal persistente de células B (PPBL; caso representativo). Se representa la media aritmética y la desviación estándar del porcentaje de células que migraron respecto al número total de células (A) y del índice de migración (B).

Se estudió también la migración de células B normales de SP, aisladas de la población de células mononucleares mediante separación inmunomagnética como se describe en Materiales y Métodos. Los LB, los cuales expresan niveles significativos de los tres receptores, migraron eficientemente en respuesta a las quimioquinas en estudio (**Figura 13**). La media del porcentaje de células migradas en respuesta a CCL19 y CCL21 fue similar a la de células LLC-B ($35,1 \pm 4,5$ y

37,3±6,2, respectivamente), aunque en un número considerable de casos la respuesta quimiotáctica de las células de LLC-B fue significativamente mayor. Por otra parte, hay que tener en cuenta que la capacidad migratoria basal de los LB es muy superior a la de las células de LLC-B. Esto también tiene como consecuencia que el índice de migración de los linfocitos normales sea significativamente menor que el obtenido en LLC-B. Respecto al porcentaje de linfocitos que migraron en respuesta a CXCL12 y CXCL13, éste fue, en general, mayor que el obtenido con células de LLC-B.

Las células de MM y LAL-B (**Figura 13**), las cuales presentaron una expresión baja o negativa de CCR7 y CXCR5, no migraron en respuesta a sus ligandos. Sólo las células mielomatosas migraron en respuesta a CXCL12, cuyo receptor, CXCR4, se expresa en su superficie a bajos o moderados niveles. Las células de PPBL (**Figura 13**), con una expresión muy baja de CCR7, CXCR5 y CXCR4, apenas respondieron a sus ligandos en los experimentos de quimiotaxis.

Como conclusión, el patrón quimiotáctico a los ligandos de CCR7, CXCR5 y CXCR4 de las diferentes subpoblaciones linfoides, normales y patológicas, correlaciona con el nivel de expresión en superficie de dichos receptores.

3.2. La estimulación de CCR7 induce la polimerización de actina en células LLC-B

La caracterización funcional del receptor CCR7 se realizó en células de LLC-B por diversas razones:

- Era la patología donde habíamos encontrado mayor intensidad de expresión de CCR7 que, junto con la también elevada expresión de CXCR4 y CXCR5, podían explicar la infiltración característica de GL que se produce en esta patología.
- La función de CCR7 y su alta expresión en las células leucémicas convertían a esta molécula en una atractiva diana terapéutica para la LLC-B, la cual constituye la leucemia más frecuente del mundo occidental sin un tratamiento curativo en la actualidad.
- Y por la mayor disponibilidad de muestras de esta patología, lo que nos permitiría poder realizar comparaciones estadísticas entre los datos *in vitro* y datos clínicos, como el estadio o factores pronósticos.

Una aproximación diferente para estudiar la respuesta a las quimioquinas es el estudio de la reorganización del citoesqueleto de actina. Encontramos que los ligandos de CCR7 y CXCR4 inducían un aumento significativo de actina F intracelular (**Figura 14A**), alcanzándose el máximo a los 15 segundos de estimulación y retornando a niveles basales entre los 3 y 5 minutos de tratamiento con las quimioquinas. La quimioquina CCL5 (10 ng/mL) no produjo ningún efecto en la reorganización del citoesqueleto de actina (**Figura 14A**).

La polimerización de actina fue máxima a concentraciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ para CCL19 y CCL21 (**Figura 14B**), y 100 ng/mL para CXCL12 (datos no mostrados).

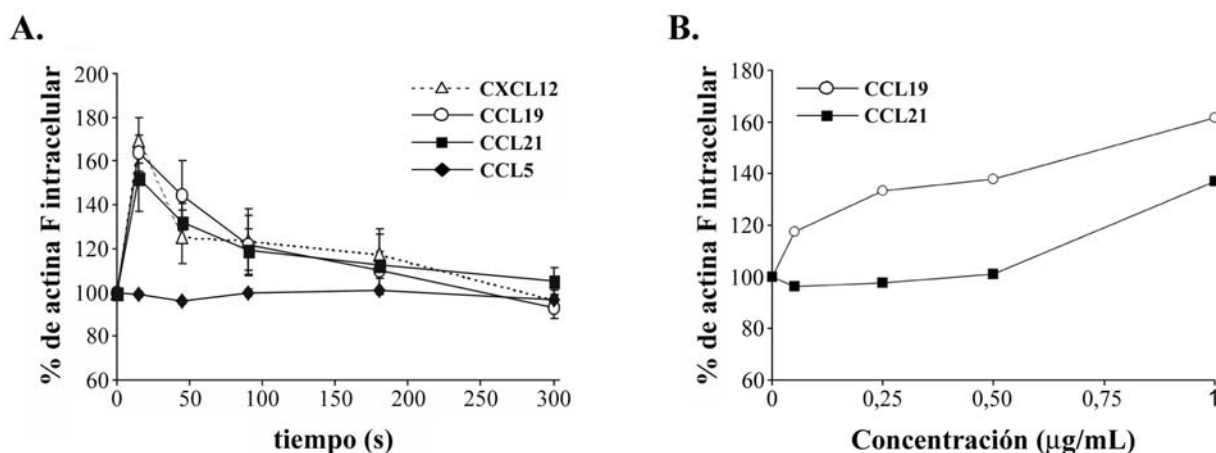


Figura 14. Los ligandos de CCR7 y CXCR4 inducen la polimerización de actina en células de LLC-B. **A.** Las células se incubaron con CCL19 (1 $\mu\text{g/mL}$), CCL21 (1 $\mu\text{g/mL}$), CXCL12 (100 ng/mL) y CCL5 (10 ng/mL) a 37°C durante diferentes períodos de tiempo. Se representa la media y el error estándar de la media ($n=7$). **B.** Las células LLC-B se estimularon durante 15 segundos con concentraciones crecientes de CCL19 y CCL21. Se muestra un caso representativo. En ambos casos, la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a las quimioquinas se cuantificó mediante marcaje con faloidina Alexa 488, como se describe en Materiales y Métodos. Se representa el porcentaje de actina F intracelular referido al basal (100%).

3.3. CCL19, pero no CCL21, induce la internalización de CCR7 en células de LLC-B

Las quimioquinas, usualmente, inducen la internalización de su receptor para regular su actividad. Por tanto, estudiamos si la unión de CCL19 y CCL21 inducía la internalización de CCR7 en células de LLC-B.

CCL19 (1 $\mu\text{g/mL}$) indujo una disminución detectable de la expresión en superficie de CCR7 ya a los 5 minutos de estimulación, alcanzándose un máximo del $55\% \pm 8$ de internalización a los 15-30 minutos (**Figura 15B**). Mayores concentraciones de CCL19 no indujeron una mayor internalización de CCR7 (**Figura 15A**). Sin embargo, CCL21 (1 $\mu\text{g/mL}$) ejerció un efecto muy débil en la internalización de CCR7, con una pérdida máxima de expresión de superficie del 20% en cada caso analizado. No se observó una mayor disminución aumentando la concentración de la quimioquina (**Figura 15A**) o el tiempo de incubación (datos no mostrados). Este efecto diferencial de CCL19 y CCL21 en la internalización de su receptor no parece dependiente del contexto celular, ya que también ha sido descrito en células T (**Bardi et al., 2001**), y lo comprobamos igualmente en una línea de células T, las células Jurkat (**Figura 15D**). Como control, CXCL12 (100 ng/mL) indujo una importante internalización de su receptor CXCR4 (**Figura 15C**), pero no de CCR7 (**Figura 15A**).

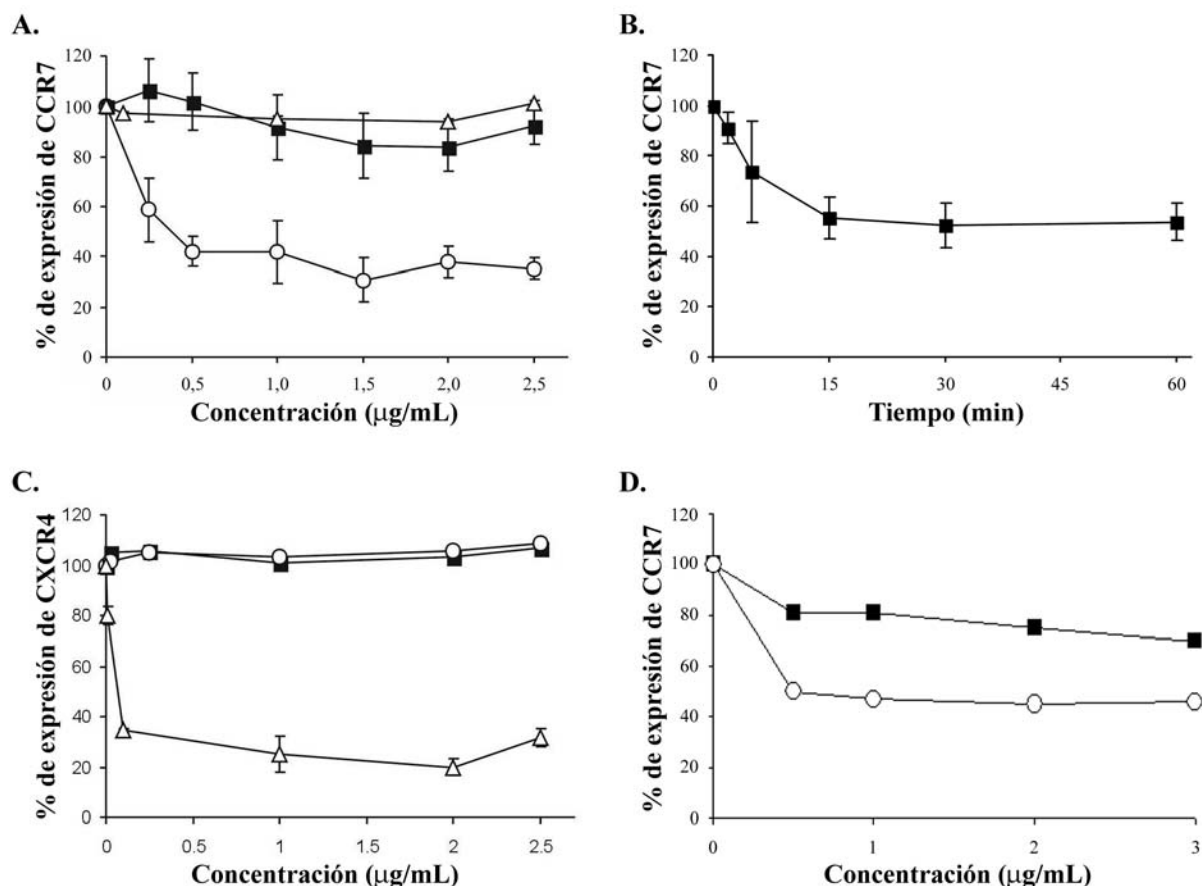


Figura 15. CCL19, pero no CCL21, induce la internalización de CCR7. Se incubaron las células de LLC-B con concentraciones crecientes de CCL19 (○), CCL21 (■) y CXCL12 (Δ) durante 1 hora a 37°C (A y C), o con CCL19 (1 µg/mL) durante diferentes periodos de tiempo a 37°C (B). A continuación, se determinó la expresión de superficie de CCR7 (A y B) y CXCR4 (C) por CMF en las células LLC-B CD19+CD5+ como se describe en Materiales y Métodos. D. Se estimularon células Jurkat con CCL19 (○) y CCL21 (■) (1 µg/mL) durante 1 hora y se analizó la expresión de CCR7 por CMF.

4. ESTUDIAR UNA POSIBLE CORRELACIÓN DE LA QUIMIOTAXIS Y LA EXPRESIÓN DE CCR7 EN CÉLULAS DE LLC-B CON LA PRESENCIA DE LINFADENOPATÍAS Y OTROS FACTORES PRONÓSTICOS

4.1. La capacidad de las células LLC-B para migrar en respuesta a los ligandos de CCR7 correlaciona con la presencia de linfadenopatía clínica en los pacientes

En los experimentos de quimiotaxis *in vitro* habíamos observado una gran variabilidad en la capacidad migratoria de las células entre los diferentes pacientes de LLC-B. Estos datos funcionales sugerían una posible correlación entre la capacidad quimiotáctica de las células y factores clínicos de estos pacientes y, en concreto, con la presencia de linfadenopatía clínica. Para verificar este punto, medimos el índice de migración de células de LLC-B en respuesta a CCL19, CCL21 y CXCL12 en

un grupo de 25 pacientes, cuyas características se describen en la **Tabla 8**: 10 casos no presentaban linfadenopatía clínica (estadio 0 de Rai), mientras que en 15 pacientes se encontraba una afectación clínica ganglionar (este grupo incluyó pacientes con estadios de Rai de I a IV).

Paciente	Estadio	Adenopatías	Tratamiento	IgV _H	CD38	IM CCL19	IM CCL21
1	0	NO	NO	NM	+	26,2	22,9
2	0	NO	NO	M	-	30,2	38,2
3	0	NO	NO	NM	-	25,4	24,3
4	0	NO	NO	NM	-	21,8	21,4
5	0	NO	NO	M	-	8,2	10,6
6	0	NO	SÍ	M	-	37,9	38,6
7	0	NO	NO	M	+	57,9	40,3
8	0	NO	NO	M	-	41,9	38,2
9	0	NO	NO	M	-	26,4	17,4
10	0	NO	NO	NM	-	22,2	18,2
11	I	SÍ	SÍ	M	+	52,9	49,7
12	I	SÍ	NO	NM	+	44,2	34,3
13	II	SÍ	NO	M	-	51,7	51,6
14	II	SÍ	SÍ	M	-	70,2	67,6
15	I	SÍ	NO	NM	-	13,2	11,7
16	I	SÍ	SÍ	M	-	38,4	35,6
17	I	SÍ	NO	NM	+	23,1	21,4
18	IV	SÍ	SÍ	NM	+	22,8	19,0
19	IV	SÍ	SÍ	NM	+	18,9	20,4
20	I	SÍ	NO	NM	-	73,2	62,0
21	I	SÍ	SÍ	NM	+	137,6	77,7
22	I	SÍ	SÍ	NM	+	81,1	88,7
23	I	SÍ	SÍ	NM	-	65,7	70,3
24	I	SÍ	NO	M	-	78,3	95,1
25	IV	SÍ	SÍ	M	+	13,6	15,6

Tabla 8. Características de los pacientes analizados. Estadio: clasificación de Rai; IgV_H NM: genes que codifican para la región variable de la cadena H de las Ig no mutados (<2% de diferencia con la secuencia de la línea germinal); M: mutado (>2% de diferencia respecto a la secuencia germinal). CD38+: más del 30% de las células patológicas positivas; CD38-: menos del 30% de las células positivas. IM: índice de migración analizado en cámaras *Transwell* como se describe en Materiales y Métodos.

Los índices de migración de células de LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7 fueron significativamente mayores en pacientes con linfadenopatía clínica que en aquellos sin afectación clínica de los GL ($p < 0,05$) (**Figura 16A**). En el caso de la migración en respuesta al ligando de CXCR4, CXCL12, los índices de migración no correlacionaron significativamente con la afectación de GL (datos no mostrados).

Debido a que los efectos migratorios de CCL21 y CCL19 están mediados por CCR7, y como resultado de la expresión variable de este receptor encontrada en las células de LLC-B, analizamos si el nivel de expresión de CCR7 correlacionaba con la presencia de linfadenopatía clínica en el mismo grupo de pacientes. Pero, en este caso, no encontramos una correlación significativa ($p = 0,5$) (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares al analizar un número mayor de pacientes (33 con

linfadenopatías y 37 sin ellas) ($p=0,22$) (**Figura 16B**). Se realizó la misma comparación con la MIF de CXCR4 y CXCR5, alcanzando resultados similares ($p=0,31$ y $p=0,9$) (**Figura 16B**).

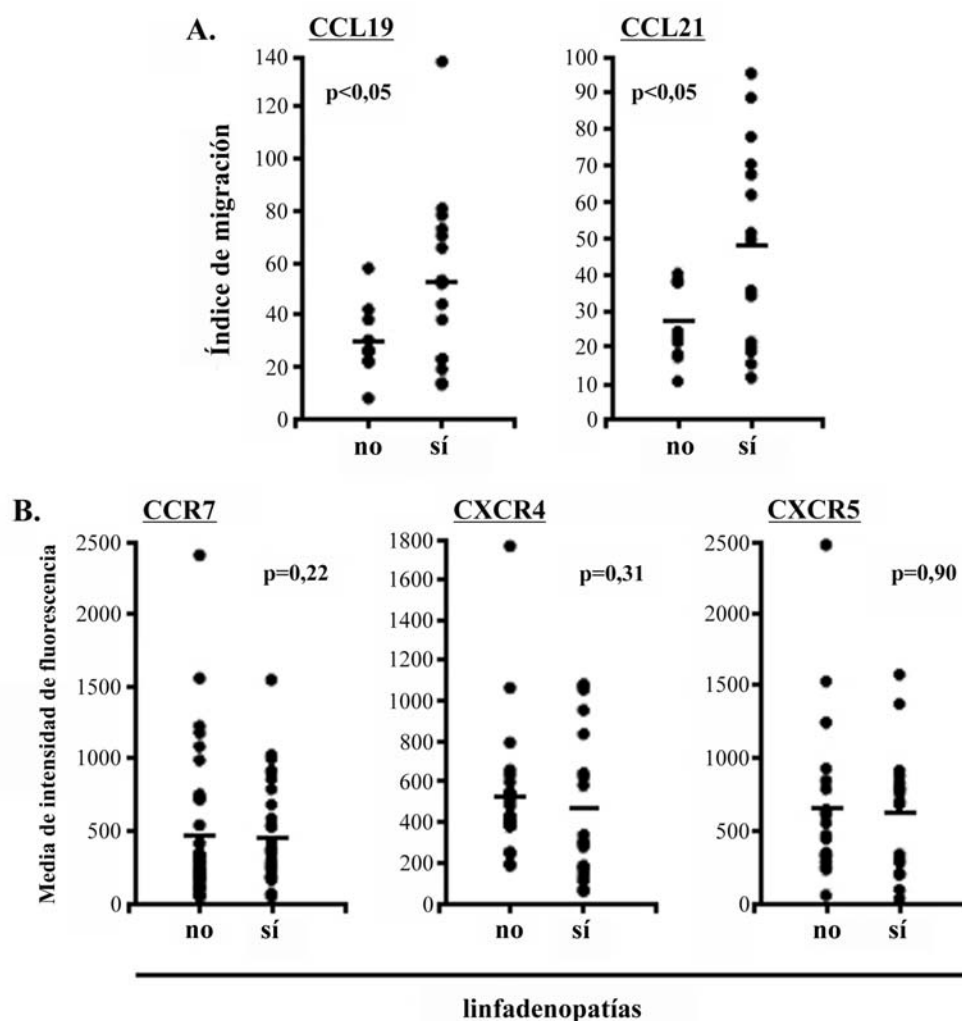


Figura 16. Los índices de migración en respuesta a CCL19 y CCL21 de células de LLC-B, pero no la expresión de CCR7, CXCR4 o CXCR5, correlacionan con la presencia de linfadenopatía clínica en los pacientes. **A.** Se midieron los índices de migración inducida por los ligandos de CCR7 (1 $\mu\text{g/mL}$) en cámaras *Transwell* en un grupo de 25 pacientes que incluyó 15 casos que presentaban linfadenopatías y 10 casos sin ellas. **B.** Se midió la expresión de CCR7, CXCR4 y CXCR5 en un grupo de 70 pacientes, que incluía 33 casos con y 37 sin linfadenopatías. La línea representa la media del índice de migración (**A**) o de la MIF (**B**) para cada grupo de pacientes. **no/sí:** pacientes sin y con linfadenopatía clínica, respectivamente.

4.2. Ni la capacidad quimiotáctica, ni la expresión de superficie de CCR7 de células de LLC-B correlaciona con diversos factores pronósticos

En la primera muestra de 25 pacientes (**Tabla 8**), se estudió una posible correlación entre la capacidad quimiotáctica de las células de LLC-B y algunos factores pronósticos de la enfermedad, en concreto, con el estado mutacional de los genes para la cadena pesada de las Ig (IgV_H) y la expresión de CD38. En aquellos momentos comenzaba a vislumbrarse la importancia de la quinasa ZAP-70

como factor pronóstico, pero todavía no estaba definido como tal, y tampoco disponíamos de las herramientas necesarias. Debido a estas razones, no se realizó dicho estudio.

En cuanto al grupo de pacientes estudiado, con respecto al estado mutacional, 13 casos presentaban más de un 98% de homología con la secuencia germinal del gen IgV_H (no mutados), mientras que los 12 casos restantes mostraban menos de un 98% de homología, con evidencias de procesos de hipermutación somática. No se encontró ninguna asociación entre el estado mutacional de las células de LLC-B y sus índices de migración ($p=0,9$ para CCL19 y $p=0,6$ para CCL21; datos no mostrados). Resultados similares se obtuvieron cuando el estado mutacional IgV_H se comparó con la intensidad de expresión de CCR7 ($p=0,6$), CXCR4 ($p=0,9$) y CXCR5 ($p=0,1$) (datos no mostrados).

La expresión de CD38 se consideró positiva cuando lo presentaban más del 30% de las células de LLC-B. Diez muestras resultaron CD38+ y 15 fueron CD38-. De forma similar al estado mutacional IgV_H, no encontramos ninguna correlación entre la expresión de CD38 y los índices de migración en respuesta a CCL21 ($p=0,9$) o CCL19 ($p=0,7$) (datos no mostrados). La correlación entre la expresión de CD38 y la intensidad de expresión de los CKR se investigó en un grupo mayor de 70 pacientes. Y, de forma similar al caso anterior, la intensidad de expresión de CCR7, CXCR4 y CXCR5 no correlacionó con la expresión de CD38 ($p=0,65$, $p=0,43$, y $p=0,17$, respectivamente; datos no mostrados).

Por tanto, la expresión de CCR7 y la migración de las células LLC-B en respuesta a sus ligandos parece ser fundamental para determinar el carácter diseminado de la enfermedad en todos los pacientes, pero otros factores pueden estar implicados en la evolución y el pronóstico.

5. CARACTERIZACIÓN DE LAS PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA QUIMIOTAXIS MEDIADA POR CCR7 DE CÉLULAS DE LLC-B

5.1. CCL19 y CCL21 inducen una fuerte activación de ERK1/2 en células de LLC-B dependiente de la señalización a través de proteínas Gi

Dado el papel que CCR7 podía estar jugando en la patogénesis de la enfermedad, nos planteamos la caracterización de las principales vías de señalización implicadas en la migración de células de LLC-B dependiente de CCR7. Nuestro primer objetivo fue el estudio del efecto de las quimioquinas CCL19 y CCL21 en el estado de activación de las MAPKs en células de LLC-B.

Se estimularon las células durante diferentes períodos de tiempo con las quimioquinas en estudio a 1 $\mu\text{g/mL}$, la dosis óptima que media migración *in vitro*. Los lisados celulares se analizaron por WB utilizando Acs específicos frente a las formas fosforiladas activas y las formas totales de las tres MAPKs principales: ERK1/2, p38SAPK y JNK (**Figura 17**).

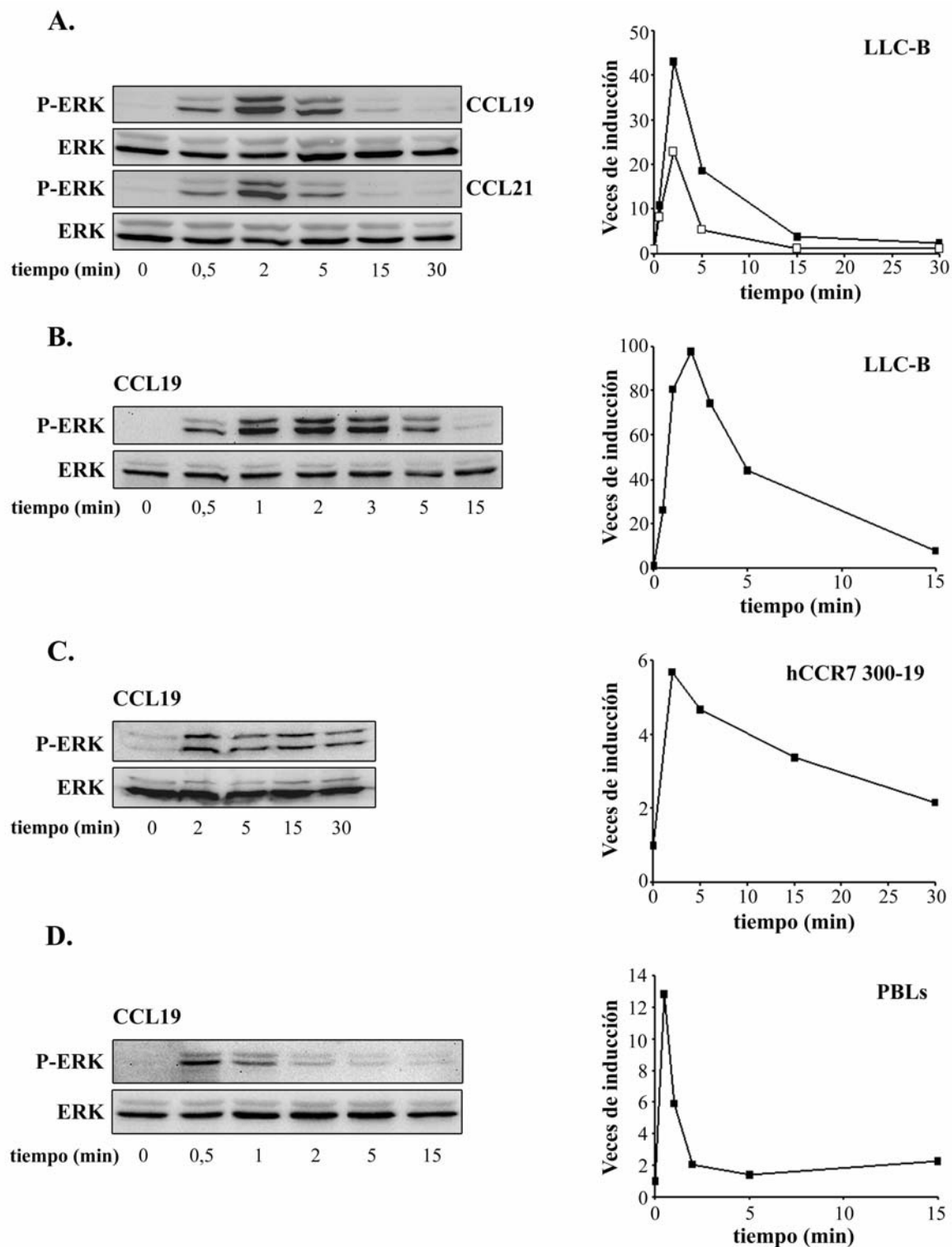


Figura 17. CCL19 y CCL21 inducen una fuerte activación de ERK1/2. Las células se estimularon con 1 μ g/mL de CCL19 (■) o CCL21 (□) durante los tiempos indicados. Se determinó la fosforilación de ERK1/2 en los lisados celulares por análisis de WB utilizando Acs específicos anti-fosfo ERK1/2. Las bandas fueron cuantificadas por quimioluminiscencia y corregidas para la expresión total de ERK1/2 en las membranas rehibridadas. Se representa la inducción de la fosforilación respecto al basal (tiempo=0). Se muestran dos experimentos representativos con células LLC-B (**A y B**) de un total de 15, y un caso representativo de la línea pre-B murina transfectada con CCR7 humano (hCCR7 300-19) (**C**) y linfocitos normales de SP (PBLs) (**D**) de un total de 3 en ambos casos.

No observamos una fosforilación constitutiva significativa de ERK1/2 en células no estimuladas. Pero tanto CCL19 como CCL21 indujeron una fuerte activación de ERK1/2 en todas las muestras de LLC-B analizadas (**Figura 17A y 17B**), que se detecta ya a los 30 segundos, alcanza un máximo de fosforilación, en todos los casos, a los 2 minutos y regresa a niveles basales a los 15-30 minutos de estimulación con las quimioquinas. La cantidad total de proteína ERK1/2, en cambio, no mostró cambios significativos tras el tratamiento con las quimioquinas. En todos los casos, CCL19 indujo una mayor fosforilación de ERK1/2 que CCL21. Se muestra un experimento representativo en la **Figura 17A**.

Por otra parte, CCL19 y CCL21 no sólo activan ERK1/2 en células de LLC-B, sino también en una línea celular pre-B de ratón transfectada con CCR7 humano (hCCR7 300-19; **Figura 17C**) y en linfocitos normales de SP (**Figura 17D**).

Ensayos dosis-respuesta mostraron que concentraciones de CCL19 y CCL21 mayores de 1 µg/mL no aumentan el nivel de fosforilación (datos no mostrados). Por otra parte, a concentraciones tan bajas como 100 ng/mL, ambas quimioquinas inducen ya una fosforilación detectable de la quinasa (**Figura 18**).

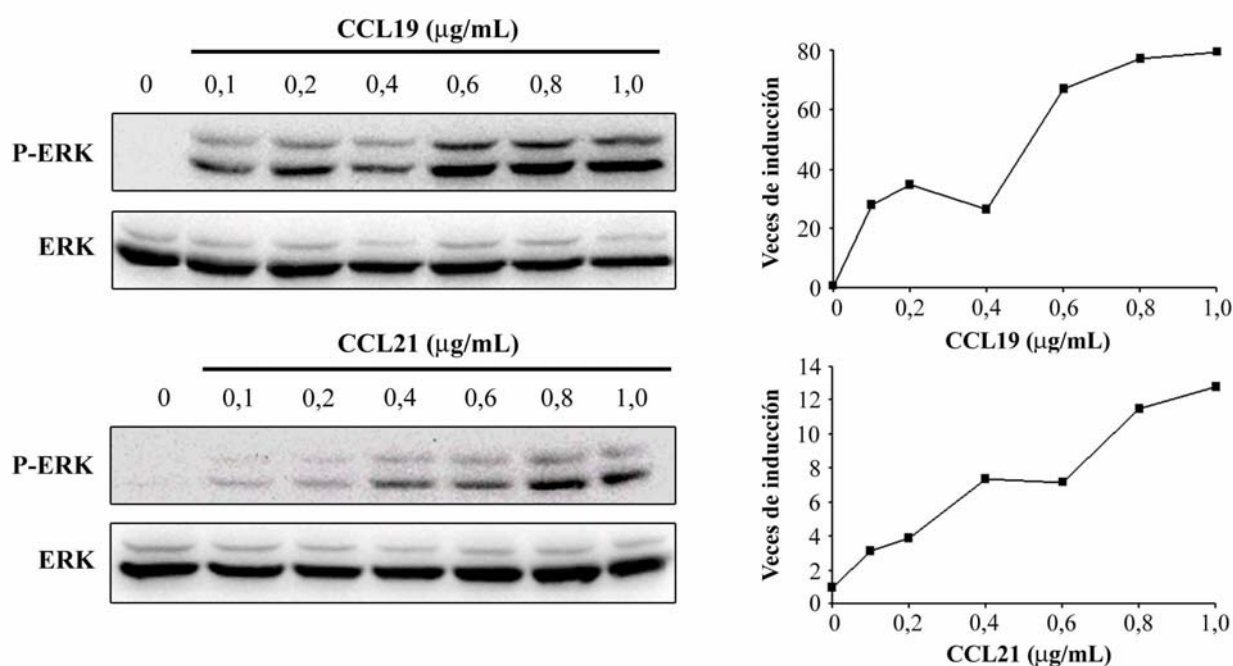


Figura 18. La fosforilación de ERK1/2 en células LLC-B es dependiente de la dosis de CCL19 y CCL21. Las células se estimularon con concentraciones crecientes de CCL19 y CCL21 hasta un máximo de 1 µg/mL. Se analizó la fosforilación de ERK1/2 por WB en los lisados celulares totales. Se representa la inducción de la fosforilación respecto al basal normalizado con la cantidad de proteína total. Se muestra un caso representativo.

Como era previsible, el pretratamiento de células LLC-B con inhibidores de MEK, PD98059 y U0126, durante 1 hora a 37°C abolió completamente la fosforilación de ERK1/2 mediada por quimioquinas (**Figura 19**). El pretratamiento con PTX produjo una inhibición del 75 al 100% de la activación de ERK1/2 inducida por los ligandos de CCR7, confirmando que la señalización es dependiente de proteínas Gi (**Figura 19**).

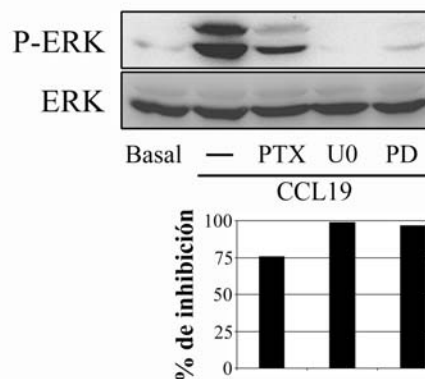


Figura 19. La fosforilación de ERK1/2 inducida por CCL19 es dependiente de MEK y la proteína Gi. Cuando fue necesario, se pretrataron las células LLC-B con los inhibidores de MEK, U0126 (5 μ M) y PD98059 (20 μ M), o PTX (100 ng/mL) durante 1 hora a 37°C. A continuación, se estimularon con la quimioquina CCL19 (1 μ g/mL) durante 2 minutos y se analizó la fosforilación de ERK1/2 por WB en los lisados celulares. Las bandas se cuantificaron por quimioluminiscencia y se corrigieron para la expresión total de la proteína en la membrana rehibridada con un Ac anti-ERK2. Se representa el porcentaje de inhibición referido a la fosforilación en presencia de la quimioquina y en ausencia de cualquier inhibidor. Se muestra un caso representativo de un total de ocho.

5.2. CCL19 y CCL21 ejercen un efecto variable en la activación constitutiva de p38SAPK y JNK en células de LLC-B

De forma similar, analizamos los efectos de CCL19 y CCL21 sobre p38SAPK y JNK, las cuáles han sido asociadas con muerte celular, diferenciación y proliferación.

En contraste al caso de ERK1/2, las células de LLC-B presentaron una fosforilación constitutiva detectable de ambas quinasas. La estimulación durante distintos períodos de tiempo con CCL19 (1 μ g/mL) tuvo un efecto variable en la activación de p38SAPK y JNK dependiendo del donante (**Figuras 20 y 21**).

En el caso representado en la **Figura 20A**, CCL19 aumentó el nivel de fosforilación de p38SAPK, alcanzando un máximo de 4 veces de inducción tras 1-2 minutos de estimulación. En otros casos, las quimioquinas no indujeron una fosforilación detectable (**Figura 20B**), o bien el incremento fue muy marcado (**Figura 20C**). Pero usualmente, en la mayoría de los casos, las quimioquinas

ejercieron un efecto moderado en el estado de fosforilación de p38SAPK, como se muestra en la **Figura 20A**. Efectos similares se observaron cuando las células se estimularon con CCL21 en lugar de CCL19 (**Figura 20B-C**).

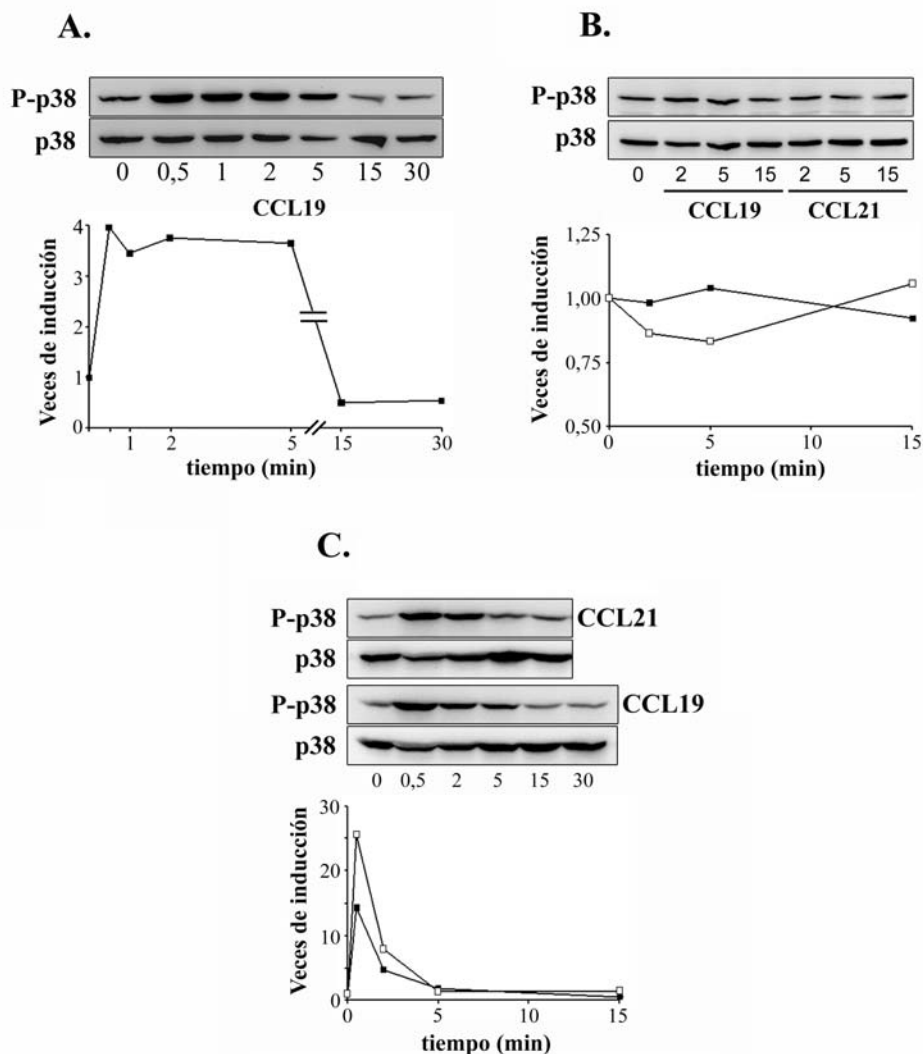


Figura 20. CCL19 y CCL21 inducen un aumento variable, dependiente del donante, en la activación constitutiva de p38SAPK en células de LLC-B. Las células LLC-B se estimularon durante diferentes períodos de tiempo con 1 µg/mL de CCL19 (■) (**A**, **B** y **C**) y CCL21 (□) (**B** y **C**). Se determinó p38SAPK doblemente fosforilado por análisis de WB utilizando un Ac específico anti-fosfo-p38SAPK. La fosforilación fue cuantificada por quimioluminiscencia y corregida para la expresión total de p38SAPK en membranas rehibridadas. Se representa la inducción de la fosforilación referida al basal.

El patrón de fosforilación de JNK recuerda al observado para p38SAPK. Como se muestra en la **Figura 21**, las células de LLC-B presentaron una fosforilación constitutiva de la quinasa, la cual apenas fue modificada por la estimulación con CCL19 a 1 $\mu\text{g/mL}$.

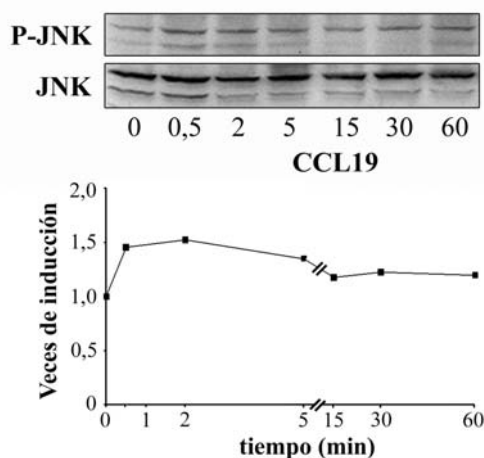


Figura 21. CCL19 ejerce un efecto variable en la fosforilación constitutiva de JNK. Se estimularon células de LLC-B durante diferentes períodos de tiempo con 1 $\mu\text{g/mL}$ de CCL19. Se determinó la doble fosforilación de JNK por análisis de WB mediante Acs específicos y la expresión total de la proteína mediante rehibridación de la membrana. Se representa la fosforilación de JNK normalizado respecto a la cantidad de proteína total y referido al nivel de fosforilación basal.

Sería interesante estudiar si la variabilidad en el nivel de fosforilación de JNK y p38SAPK mediada por CCR7, frente al comportamiento idéntico de todos los donantes en la activación de ERK1/2 inducida por CCL19 y CCL21, podría tener alguna implicación en la patogénesis de la enfermedad.

5.3. Jerarquía de activación de las MAPKs en células de LLC-B

Nos planteamos el análisis de una posible relación entre las cascadas de activación de los miembros de la familia de las MAPKs. En primer lugar, estudiamos el efecto de los inhibidores de JNK (SP600125) y p38SAPK (SB203580) en la fosforilación de ERK1/2 mediada por CCR7. Para ello, previamente determinamos las concentraciones óptimas de los inhibidores por análisis de WB.

Para determinar la dosis óptima del inhibidor de JNK, SP600125, estudiamos sus efectos en la fosforilación de JNK ya que, aunque actúa de forma competitiva con la MAPK, también afecta a MKK4, responsable de su fosforilación. Tratamos células LLC-B con CCL19 (1 $\mu\text{g/mL}$) y dosis crecientes de SP600125 hasta un máximo de 200 μM , observando ya una inhibición de la fosforilación inducida por la quimioquina mayor del 90% a dosis de 15-30 μM (**Figura 22A**).

En el caso de p38SAPK, recurrimos al estudio de la fosforilación de uno de sus efectores, ATF-2, para valorar el efecto del inhibidor, ya que éste actúa, principalmente, compitiendo con el ATP para disminuir la actividad de la quinasa. Se observa cómo una concentración de 20 μM de SB203580 produce ya un 75% de inhibición de la fosforilación de ATF-2. Mayores dosis no mejoran notablemente el porcentaje de inhibición (**Figura 22B**).

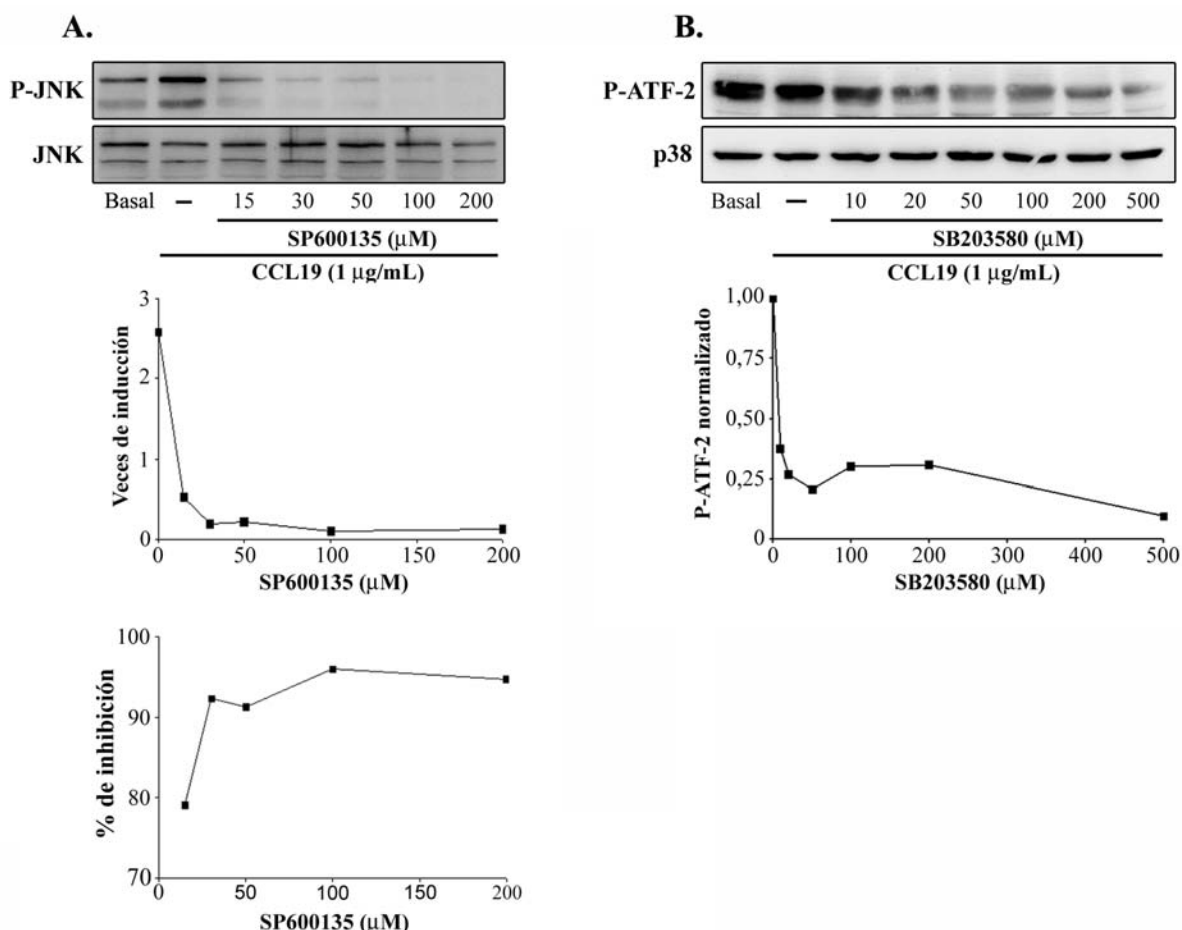


Figura 22. Efecto en la fosforilación basal o inducida por CCL19 de JNK y ATF-2 (efector de p38SAPK) de diferentes dosis de SP600125 y SB203580, respectivamente. Células de LLC-B se trataron con dosis crecientes del inhibidor de JNK (SP600125) (**A**) o de p38SAPK (SB203580) (**B**) durante 1 hora a 37°C y estimularon o no con 1 $\mu\text{g/mL}$ de CCL19. **A.** Se determinó la fosforilación de JNK en los lisados celulares. Se representa la fosforilación de la quinasa normalizada respecto a la cantidad de proteína total y referido a la fosforilación basal (veces de inducción), así como el porcentaje de inhibición de cada dosis de SP600125 respecto a la fosforilación inducida por CCL19. **B.** Análisis de la fosforilación de ATF-2 en los lisados celulares. Se representa la cantidad normalizada de fosfo-ATF-2 respecto a la cantidad total de la proteína p38 en la membrana rehibridada y referido al nivel de fosforilación en las células estimuladas con la quimioquina y no tratadas con el inhibidor. En ambos casos se muestra un caso representativo de un total de tres.

Una vez determinadas las dosis óptimas de los inhibidores SP600125 (30 μM) y SB203580 (20 μM), estudiamos su efecto sobre la fosforilación de ERK1/2 mediada por CCR7. El pretratamiento con el inhibidor de JNK SP600125 o el inhibidor de p38SAPK SB203580 produjo una

disminución del 40 y el 80% del nivel de fosforilación de ERK1/2, respectivamente (**Figura 23A**). El mismo efecto observamos en los casos representados en las **Figuras 23B y 23C**.

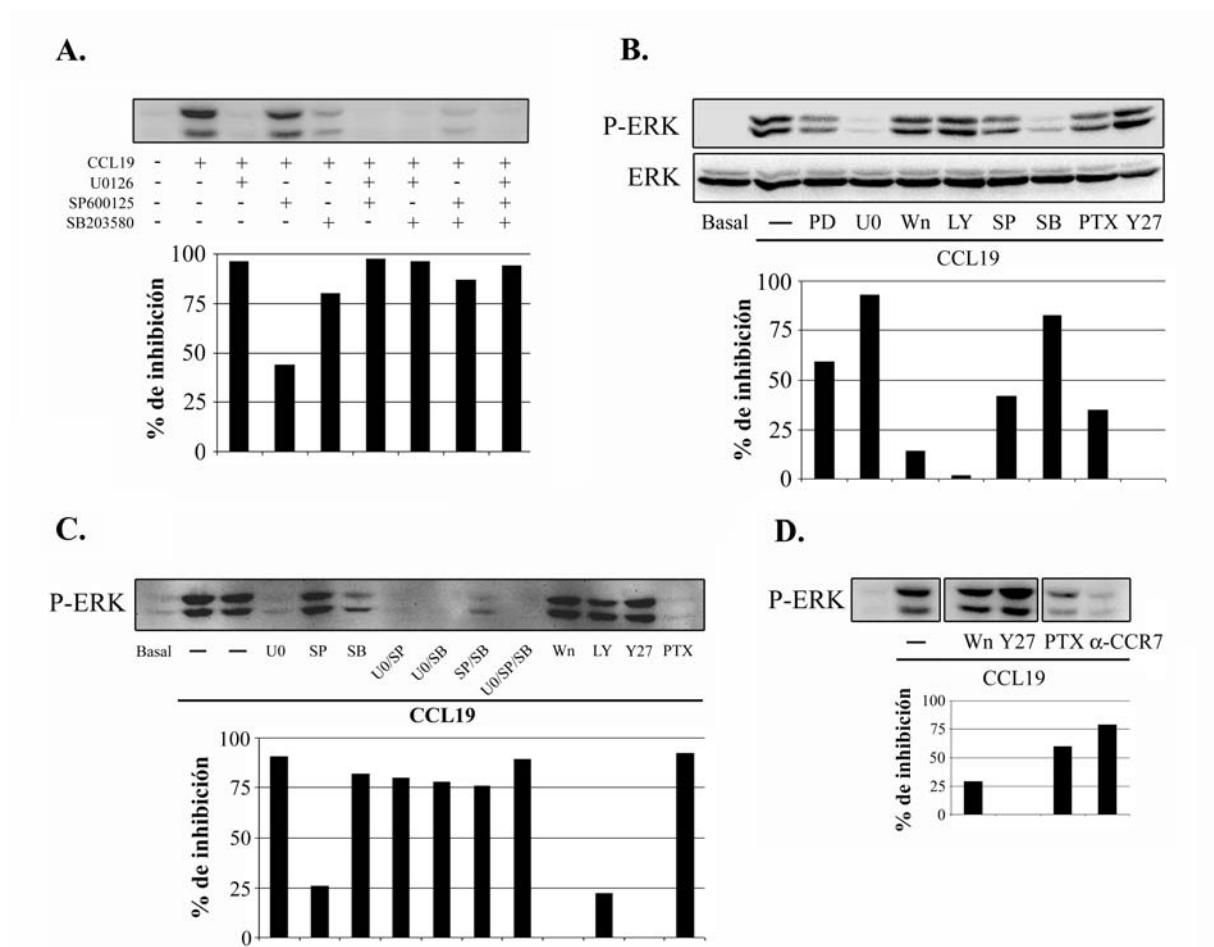


Figura 23. La fosforilación de ERK1/2 mediada por CCR7, independiente de la actividad PI3K, está regulada por proteínas Gi, p38SAPK y, en menor medida, por JNK. Las células de LLC-B fueron pretratadas con toxina pertúsica (PTX; 100 ng/mL), U0126 (5 μ M), PD98059 (20 μ M), SP600125 (30 μ M), SB203580 (20 μ M), wortmanina (0,5 μ M), LY294002 (20 μ M), Y-27632 (30 μ M) y/o anti-CCR7 (2 μ g/mL) durante 1 hora a 37°C. Las células de LLC-B, tratadas o no con los inhibidores, fueron estimuladas con 1 μ g/mL de CCL19 durante 2 minutos. La cantidad de ERK1/2 fosforilado y total fue analizada en los lisados celulares. Se representa el porcentaje de inhibición comparado con la fosforilación de ERK1/2 en células no pretratadas con los inhibidores y estimuladas con la quimioquina. Se muestran los resultados de cuatro muestras representativas de un total de ocho.

Como hay evidencias que sugieren que la activación por quimioquinas de ERK1/2 independiente de Ras puede implicar la activación de PI3K γ (**Curnock *et al.*, 2002**), estudiamos un posible papel de la PI3K en la activación de ERK1/2 inducida por CCL19 y CCL21. Las células de LLC-B fueron pretratadas con los inhibidores de PI3K wortmanina y LY294002 durante 1 hora a 37°C, previo a la estimulación por quimioquinas, lisis y análisis mediante WB. Ninguno de los inhibidores afectó a la fosforilación de ERK1/2 inducida por CCL19 y CCL21, así como tampoco el

inhibidor de ROCK, Y-27632 (**Figura 23B-D**). Por otra parte, volvemos a observar el bloqueo de la fosforilación de ERK1/2 dependiente de CCR7 mediante el pretratamiento con PTX o un Ac anti-CCR7 humano bloqueante (**Figura 23**).

En conclusión, en células de LLC-B, los ligandos de CCR7 inducen una fuerte activación de ERK1/2 independiente de PI3K y regulada por proteínas Gi, p38SAPK y, en menor medida, por la actividad de JNK.

El efecto del pretratamiento de las células LLC-B con el inhibidor de ERK1/2 U0126 sobre el estado de fosforilación de p38SAPK no fue tan reproducible como en el caso contrario. En algunas muestras, U0126 no afectó significativamente a la activación de la quinasa (**Figura 24A**). En cambio, en otros casos, sí que produjo una inhibición significativa de la fosforilación de p38SAPK inducida por CCL19 (**Figura 24B**). En conclusión, no parece que la posible implicación de ERK1/2 en la activación de p38SAPK inducida por la estimulación de CCR7 sea un fenómeno general en todos los pacientes.

De forma interesante, en todos los donantes, la inhibición de la actividad JNK con SP600125 produjo un fuerte incremento de la fosforilación de p38SAPK (**Figura 24**), alcanzando en algunos casos de 30 a 40 veces de inducción respecto a las células no tratadas (**Figura 24B**).

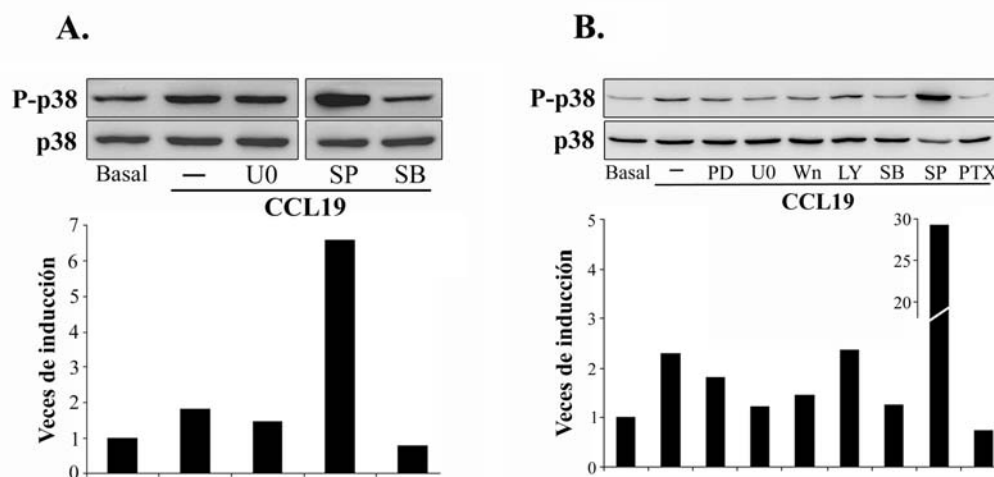


Figura 24. Efecto de los inhibidores de las principales MAPKs sobre la fosforilación de p38SAPK. Las células LLC-B fueron pretratadas con U0126 (5 μ M), PD98059 (20 μ M), SP600125 (30 μ M), SB203580 (20 μ M), wortmanina (0,5 μ M), LY294002 (20 μ M) y PTX (100 ng/mL) durante 1 hora a 37°C o no tratadas y estimuladas con 1 μ g/mL de CCL19 durante 1 minuto. Se analizó p38SAPK fosforilado y total en los lisados celulares. Se representa la fosforilación de p38SAPK normalizado respecto a la cantidad de proteína total y referido a la fosforilación basal. Se muestran dos casos representativos de un total de ocho.

Por otra parte, en la **Figura 24B** observamos cómo, al igual que en el caso de ERK1/2, la fosforilación mediada por CCL19 de la quinasa es dependiente de la señalización a través de proteínas Gi.

Efectos similares se observaron cuando las células de LLC-B fueron estimuladas con CCL21 en lugar de CCL19 (datos no mostrados).

Por último, la activación de JNK fue independiente de la actividad de ERK1/2 y p38SAPK (Figura 25).

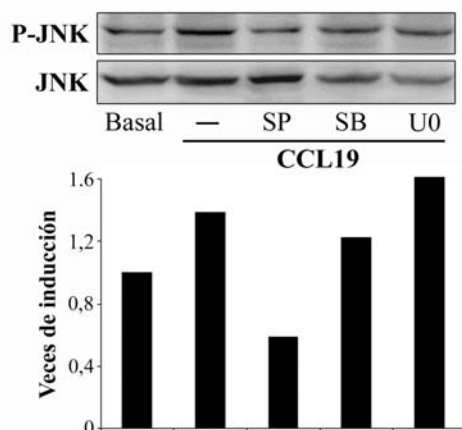


Figura 25. La activación de JNK es independiente de la actividad de ERK1/2 y p38SAPK. Las células fueron pretratadas con SP600125 (30 μ M), SB203580 (20 μ M) y U0126 (5 μ M) durante 1 hora a 37°C o no tratadas y estimuladas con 1 μ g/mL CCL19 durante 1 minuto. Se determinó la doble fosforilación de JNK por análisis de WB mediante Ac específicos y la expresión total de la proteína mediante rehibridación de la membrana. Se representa la fosforilación de JNK normalizado respecto a la cantidad de proteína total y referido al nivel de fosforilación basal. Se muestra un caso representativo de un total de cinco.

5.4. La quimiotaxis de células de LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7 no está mediada por la activación de la cascada de las MAPKs

La principal función de las quimioquinas es regular la migración celular. Debido a la potente activación de ERK1/2 inducida por CCL19/21, analizamos si esta activación era necesaria para la quimiotaxis mediada por CCR7 en células de LLC-B.

Se pretrataron las células de LLC-B con los inhibidores específicos de las tres MAPKs por separado, en pares, o los tres juntos durante 1 hora a 37°C. Los inhibidores de JNK y p38SAPK (SP600125 y SB203580, respectivamente) se utilizaron a las concentraciones óptimas determinadas anteriormente por WB (Figura 22). Asimismo, en el caso de U0126, inhibidor de MEK, se utilizó la concentración (5 μ M) que inhibe de manera efectiva la fosforilación de ERK1/2 analizada por WB (Figura 19).

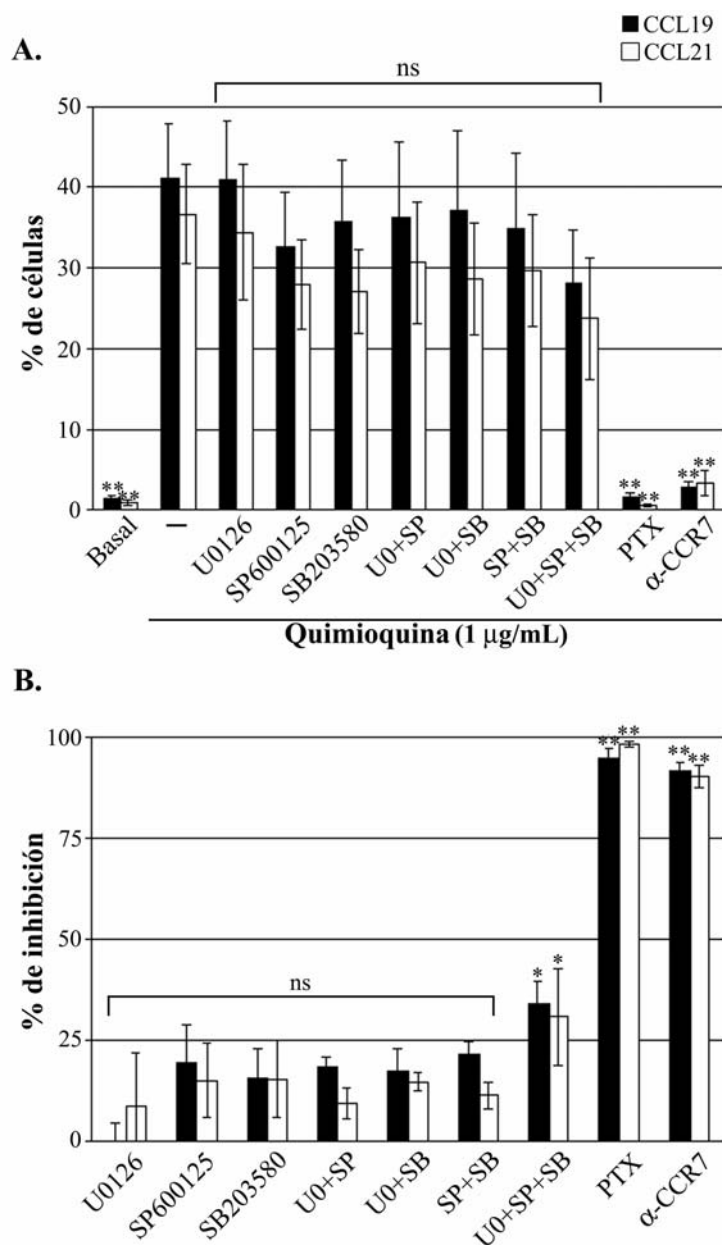


Figura 26. La quimiotaxis de células LLC-B en respuesta a ambos ligandos de CCR7 no está mediada por la activación de MAPKs. La quimiotaxis inducida por CCL19 (1 µg/mL; barras negras, n=8) y CCL21 (1 µg/mL; barras blancas, n=5) fue analizada en cámaras *Transwell* como se describe en Materiales y Métodos. Cuando fue necesario, se pretrataron las células LLC-B durante 1 hora a 37°C con los inhibidores de ERK1/2 (U0126, 5 µM), JNK (SP600125, 30 µM) y p38SAPK (SB203580, 20 µM) solos o en combinación. Se utilizó, como control positivo de inhibición, el pretratamiento con PTX (100 ng/mL) y un Ac monoclonal anti-CCR7 bloqueante (2 µg/mL). **A.** Los resultados se expresan como porcentaje de células que han migrado. **B.** Se representan los porcentajes de inhibición de la migración causados por cada molécula comparado con la quimiotaxis en ausencia de cualquier inhibidor. Se muestra la media aritmética y las barras de error estándar de la media. Abreviaturas: ns: no significativo; *: p<0,05; **: p<0,001.

Se realizaron ensayos de quimiotaxis *in vitro* en cámaras *Transwell* con CCL19 o CCL21 en el pocillo inferior a 1 µg/mL, la concentración óptima en ensayos de migración. Encontramos, de forma muy interesante, que ni la inhibición de ERK1/2, ni de p38SAPK o JNK afectó significativamente a la quimiotaxis de las células LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7, con

independencia de la variabilidad característica en la respuesta migratoria de las células en función del donante (**Figura 26**).

El pretratamiento con U0126 (5 μ M), el inhibidor de ERK1/2, no tuvo ningún efecto en la migración en respuesta a CCL19 y CCL21. En paralelo a la variabilidad dependiente del donante observada en la activación de p38SAPK y JNK en los análisis de WB, los resultados obtenidos en los ensayos de *Transwell* con sus respectivos inhibidores, SB203580 (20 μ M) y SP600125 (30 μ M), no fueron tan homogéneos como con U0126. Pero, a pesar de esta pequeña variabilidad, observamos que ni JNK ni p38SAPK juegan un papel central en la migración de células LLC-B hacia los ligandos de CCR7. En particular, la inhibición de JNK produjo una reducción no significativa del $19,4\% \pm 9,4$ (media \pm error estándar de la media), en la migración dependiente de CCL19, y del $15,2\% \pm 9,1$ en la migración celular a CCL21. De forma similar, SB203580 no inhibió significativamente la quimiotaxis inducida por CCL19 ($15,9\% \pm 7,1$) ni por CCL21 ($15,6\% \pm 9,4$).

El uso de los inhibidores farmacológicos combinados no produjo una mayor inhibición que su uso independiente. Sólo un fuerte tratamiento de las células LLC-B con los tres inhibidores de MAPKs simultáneamente produjo una reducción de la migración inducida por CCR7 alrededor del 30-34% para ambas quimioquinas, siendo en la mayoría de los casos menor del 20%. Como control, el pretratamiento celular con PTX o con un Ac monoclonal anti-CCR7 humano bloqueante inhibió la migración inducida por las quimioquinas en un 90-100%.

En ningún caso, el tratamiento con los inhibidores afectó a la expresión en superficie de CCR7 o a la viabilidad celular (datos no mostrados). Asimismo, el pretratamiento en las mismas condiciones con dimetil sulfóxido (DMSO) (1 μ L/mL), disolvente de algunos de los inhibidores utilizados, no afectó a la migración inducida por las quimioquinas (datos no mostrados).

En conclusión, la migración de células LLC-B mediada por CCR7 no es dependiente de la actividad de las tres principales MAPKs.

5.5. PI3K y ROCK regulan la quimiotaxis dependiente de CCR7 de células LLC-B

A pesar de la fuerte activación de ERK1/2 inducida por CCL19 y CCL21, esta quinasa no mediaba la migración de las células leucémicas en respuesta a las mismas quimioquinas. Por tanto, estudiamos el posible papel de vías de señalización alternativas.

Se ha demostrado el papel de PI3K de clase I en el control de la quimiotaxis y la reorganización del citoesqueleto inducida por quimioquinas en leucocitos. Así que, en primer lugar,

nos planteamos estudiar si las quimioquinas inducían la activación de PI3K en células LLC-B, a través del análisis de la fosforilación de su efector mejor conocido, Akt/PKB, el cual juega un papel fundamental en promover la supervivencia celular y la quimiotaxis de diferentes tipos celulares.

Se detectó un bajo nivel de Akt constitutivamente fosforilado en células de LLC-B, el cual aumentó tras tratamiento con CCL19 a tiempos tan cortos como 30 segundos, alcanzando un máximo tras 2-5 minutos de estimulación (**Figura 27**), y volviendo a niveles cercanos al basal a los 30 minutos (**Figura 27A**). El pretratamiento celular con dos inhibidores de PI3K de clase I ampliamente utilizados, el metabolito fúngico wortmanina (0,5 μ M) y el compuesto farmacológico LY294002 (20 μ M), no abolió la fosforilación basal de Akt en todos los casos (**Figura 27A**), aunque sí inhibió el aumento de fosforilación inducido por CCL19, consistente con la conclusión de que Akt es fosforilado a través de la vía de señalización PI3K tras estimulación con la quimioquina.

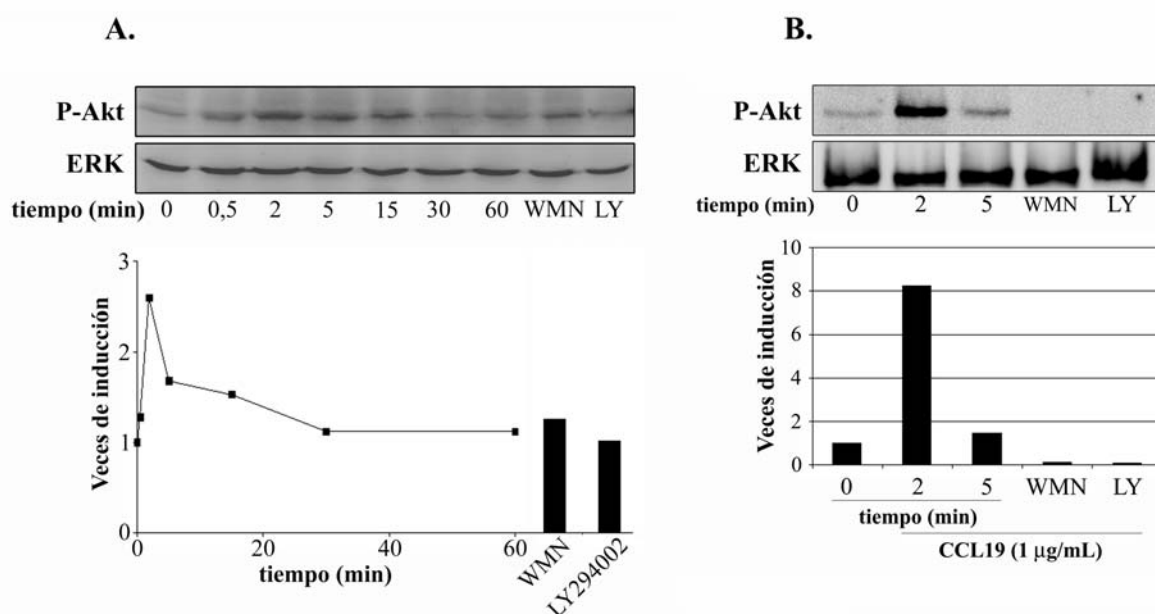


Figura 27. La estimulación de células LLC-B con CCL19 produce un aumento de la fosforilación de Akt/PKB. Las células LLC-B de dos pacientes diferentes fueron estimuladas durante distintos períodos de tiempo con CCL19 (1 μ g/mL), o no tratadas. En algunos casos, las células fueron pretratadas con wortmanina (WMN, 0,5 μ M) o LY294002 (20 μ M) durante 1 hora a 37°C previo a la estimulación durante 5 minutos con la quimioquina. Las células fueron lisadas y Akt/PKB fosforilado fue revelado por *immunoblotting* con Acs policlonales anti-fosfo-Akt (Ser473). Se rehibridó la membrana con un Ac anti-ERK2 como control de carga. Se representan las veces de inducción respecto a la fosforilación basal tanto en los diferentes tiempos, como tras el pretratamiento con wortmanina y LY294002. Se muestran dos casos representativos de un total de cinco.

A continuación, para estudiar el posible papel de PI3K en la quimiotaxis inducida por CCL19 y CCL21, se trataron las células LLC-B durante 1 hora a 37°C, previo al ensayo de quimiotaxis *in vitro*, con wortmanina y LY294002 a concentraciones que abolieron la fosforilación de Akt inducida por CCL19 (**Figura 27**), 0,5 μ M y 20 μ M, respectivamente.

Ambos, wortmanina y LY294002, inhibieron significativamente la quimiotaxis mediada por CCL19 y CCL21 (**Figura 28**). El descenso del número de células migradas en respuesta a CCL19 alcanzó una media del $45,3\% \pm 6,5$ y $40,7\% \pm 7,4$ con wortmanina y LY294002, respectivamente, con un rango que abarcó entre un 25 y un 77% de inhibición. En el caso de CCL21, los porcentajes de inhibición obtenidos fueron $52,7\% \pm 10,0$ y $43,2\% \pm 8,8$, demostrando un papel de la vía de señalización PI3K en la regulación de la quimiotaxis dependiente de CCR7 en células de LLC-B (**Figura 28B**).

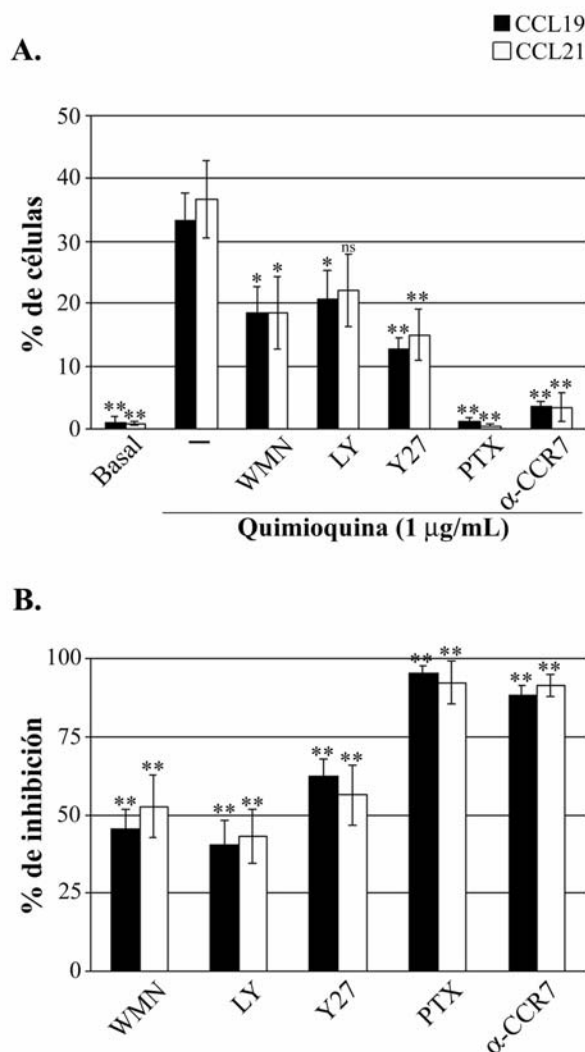


Figura 28. La quimiotaxis de células LLC-B mediada por CCR7 es dependiente de la actividad de PI3K y ROCK. Se determinó la quimiotaxis en cámaras *Transwell* como se describe en Materiales y Métodos. La migración en respuesta a CCL19 (1 µg/mL; barras negras, n=8) y CCL21 (1 µg/mL; barras blancas, n=5) tuvo lugar durante 4 horas a 37°C. Se pretrataron las células de LLC-B durante 1 hora a 37°C con wortmanina (0,5 µM), LY294002 (20 µM), Y-27632 (20 µM), PTX (100 ng/mL) y anti-CCR7 (2 µg/mL). **A.** Los resultados se expresan como porcentaje de células migradas. **B.** Porcentajes de inhibición causada por cada molécula comparada con la quimiotaxis en ausencia de cualquier inhibidor. Se representa la media aritmética y el error estándar de la media. Abreviaturas: **ns**: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$.

Por otro lado, simplemente comentar que en la **Figura 28** se puede observar cómo la inhibición de la migración por wortmanina y LY294002 resulta estadísticamente muy significativa ($p < 0,001$) cuando nos referimos al porcentaje de inhibición. En cambio, cuando se analiza el porcentaje de células migradas, en la quimiotaxis dependiente de CCL21 en presencia de LY294002, a pesar de que disminuye considerablemente el número de células, no se alcanza significación estadística ($p > 0,05$). Este hecho se debe a que, como se ha comentado anteriormente, el nivel de quimiotaxis difiere considerablemente entre los distintos donantes, como se puede observar en las desviaciones estándar obtenidas. De hecho, anteriormente habíamos observado que estas diferencias correlacionaban con la presencia de linfadenopatías en los pacientes (**Figura 16**). Esto hace que el rango de resultados sea muy amplio, tanto en ausencia como en presencia de los inhibidores, y que resulte más difícil encontrar resultados estadísticamente significativos. Al relativizar los valores refiriendo los datos obtenidos en cada caso en presencia de inhibidor, con la migración obtenida en ausencia de él, los resultados se homogeneizan y se puede observar como en cada muestra individualmente la inhibición es considerable y se alcanza significación estadística ($p < 0,001$).

Estudiamos la dependencia de la quimiotaxis de células de LLC-B mediada por CCR7 de la dosis de wortmanina y LY294002 utilizada, testando un rango de concentración de 10 nM a 1 μ M, y de 1 a 20 μ M, respectivamente. Con una dosis de 50 nM de wortmanina se observó un $20\% \pm 18$ (media \pm desviación estándar) de inhibición, alcanzándose la máxima disminución del número de células migradas en respuesta a CCL19 con 300 nM del inhibidor (**Figura 29**). De todas formas, existió cierta variabilidad entre donantes, alcanzándose ya en algunos casos el 50% de inhibición con 50 nM. La migración dependiente de CCR7 de células LLC-B también fue dependiente de la dosis de LY294002 utilizada. La inhibición obtenida con una dosis de 5 μ M fue del $24\% \pm 16$ aunque, igual que en el caso anterior, en algunos pacientes se obtuvo ya el máximo de inhibición.

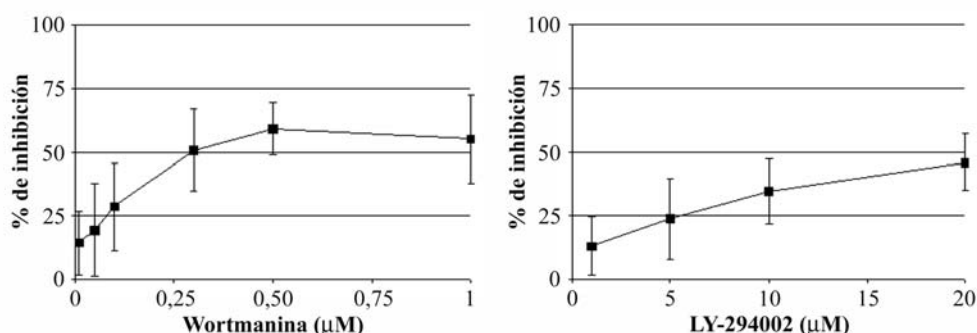


Figura 29. La inhibición de la quimiotaxis *in vitro* de células LLC-B en respuesta a CCL19 es dependiente de la dosis de los inhibidores de PI3K wortmanina y LY294002 utilizada. Las células de LLC-B se pretrataron con diferentes concentraciones de los inhibidores durante 1 hora a 37°C previo a la determinación de la migración celular en cámaras *Transwell*. Se representa la media y la desviación estándar ($n=5$) del porcentaje de inhibición de la migración celular respecto a la quimiotaxis en ausencia de inhibidor.

Para profundizar en el estudio de la implicación de la PI3K en la migración de células LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7, se realizaron experimentos de transfección transitoria con diferentes formas de las subunidades de PI3K. La sobreexpresión de la forma dominante negativa de la subunidad p85 ($\Delta p85\alpha$ -GFP) produjo una marcada disminución de la quimiotaxis dependiente de CCR7 de células LLC-B (**Figura 30**). En cambio, la nucleofección del mutante constitutivamente activo (pCDNA3-p110CAAX) aumentó significativamente la migración celular, por tanto, confirmando el papel crucial de PI3K de clase I en la quimiotaxis de células LLC-B mediada por CCR7.

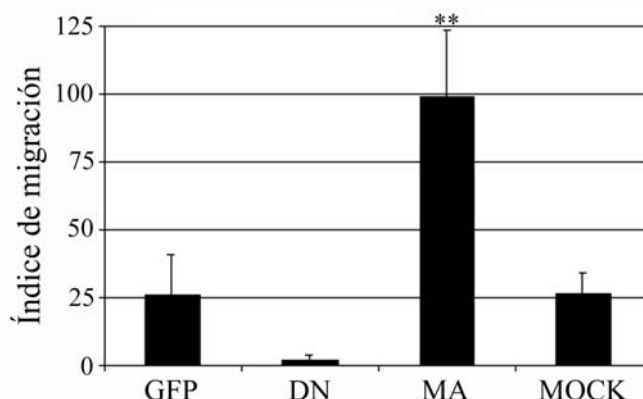


Figura 30. Experimentos de nucleofección con las formas dominante negativa y constitutivamente activa de PI3K demuestran un papel crucial de dicha molécula en la migración de células LLC-B mediada por CCL19. Antes de realizar el ensayo de quimiotaxis *in vitro* en respuesta a CCL19 (1 $\mu\text{g/mL}$), se nucleofectaron las células LLC-B, como se describe en Materiales y Métodos, con el plásmido para la forma dominante negativa ($\Delta p85\alpha$ -GFP), el mutante activo (pCDNA3-p110CAAX) o el vector de expresión de la GFP. Como control de que el proceso de nucleofección no afectaba a la capacidad migratoria de las células o a su viabilidad, se realizó también el ensayo con células tratadas con la solución de nucleofección (MOCK). Se representa la media y el error estándar de la media del índice de migración de 3 experimentos independientes. Abreviaturas: **GFP**: proteína verde fluorescente; **DN**: dominante negativo; **MA**: mutante activo; **: $p < 0,001$.

El hecho de que ni la wortmanina ni LY294002 inhibieran completamente la migración celular, sugería que moléculas adicionales regulan la quimiotaxis inducida por CCR7. En este sentido, las Rho GTPasas y sus efectores, incluyendo la serina/treonina quinasa ROCK, modulan la reorganización de actina, crucialmente implicada en la regulación de la quimiotaxis. Por tanto, analizamos el efecto de Y-27632, un inhibidor específico del efector de Rho, ROCK. El pretratamiento de células LLC-B con Y-27632 inhibió marcadamente la quimiotaxis en respuesta a CCL19 o CCL21, con una media de inhibición entre el 56 y el 62% en ambos casos ($p < 0,001$), alcanzando en algunos pacientes valores de 70-87% (**Figura 28**).

Al igual que en el caso de los inhibidores de PI3K, se testó el efecto de varias concentraciones de Y-27632, desde 1 μM hasta 20 μM (**Figura 31**). Con una dosis baja de 1 μM se obtiene ya una inhibición del $20\% \pm 20$, que alcanza un valor del $56\% \pm 21$ al aumentar la dosis del inhibidor de ROCK a 5 μM . El uso de dosis mayores de 10 y 20 μM sólo mejora levemente el nivel de inhibición.

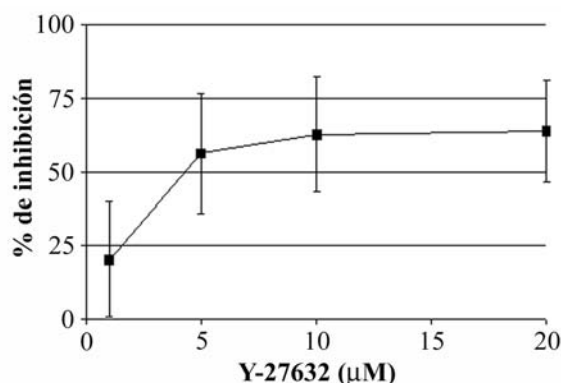


Figura 31. Efecto de diferentes concentraciones del inhibidor Y-27632 en la quimiotaxis de células LLC-B. Las células se pretrataron con concentraciones crecientes de Y-27632 durante 1 hora a 37°C previo a la determinación de la migración celular en cámaras *Transwell*. Se representa el porcentaje de inhibición de la migración celular respecto a la quimiotaxis en ausencia de inhibidor. Se muestra la media y la desviación estándar de 5 experimentos independientes.

En resumen, los resultados indican que la vía Rho/ROCK, junto con la PI3K, regulan la quimiotaxis dependiente de CCR7 en células de LLC-B.

5.6. ROCK, pero no PI3K, regula la quimiotaxis dependiente de CCR7 de células B normales de sangre periférica

A continuación, estudiamos si las mismas vías que regulan la quimiotaxis de células LLC-B mediaban la quimiotaxis de células B normales. Para este propósito, LB normales fueron aislados de bolsas de concentrado sanguíneo de donantes sanos. La pureza de las células B obtenidas tras selección positiva inmunomagnética fue mayor del 97% (datos no mostrados). Los ensayos de quimiotaxis *in vitro* se realizaron en las mismas condiciones experimentales utilizadas para células LLC-B.

Como ya habíamos visto en la primera fase del estudio, las células B normales mostraron una fuerte respuesta quimiotáctica en respuesta a 1 μg/mL de CCL19 (**Figura 32**). Como en el caso de células LLC-B, el pretratamiento de células B normales con el inhibidor específico de ROCK, Y-27632, causó una inhibición significativa de la quimiotaxis en respuesta a CCL19, produciendo una disminución del 41,7 al 71,6% del porcentaje de células migradas ($55,0\% \pm 8,8$, $n=3$). Y también del mismo modo que se produjo en células leucémicas, la inhibición de cualquiera de las tres principales MAPKs no afectó de manera significativa a la migración celular, ni solos, ni en pares, o incluso pretratando las células con los inhibidores de ERK1/2, JNK y p38SAPK simultáneamente.

Pero de manera muy interesante, a diferencia de lo que se observó en células de LLC-B, el pretratamiento con wortmanina o LY294002 no afectó de manera significativa a la quimiotaxis de

células B normales, con una media de inhibición de $3,4\% \pm 6,0$ y $4,3\% \pm 9,7$, respectivamente. Sólo en un caso de tres, la disminución de la migración alcanzó el 15-20% con los inhibidores de PI3K. El pretratamiento con PTX y un Ac monoclonal anti-CCR7, utilizados como control positivo de inhibición, produjo una disminución del $81\% \pm 4$ y $73\% \pm 7,8$, respectivamente.

En conclusión, la migración de células B normales de SP es fuertemente dependiente de la actividad de Rho/ROCK, pero independiente de la actividad de MAPKs y, a diferencia de lo que ocurre en LLC-B, de la vía PI3K/Akt.

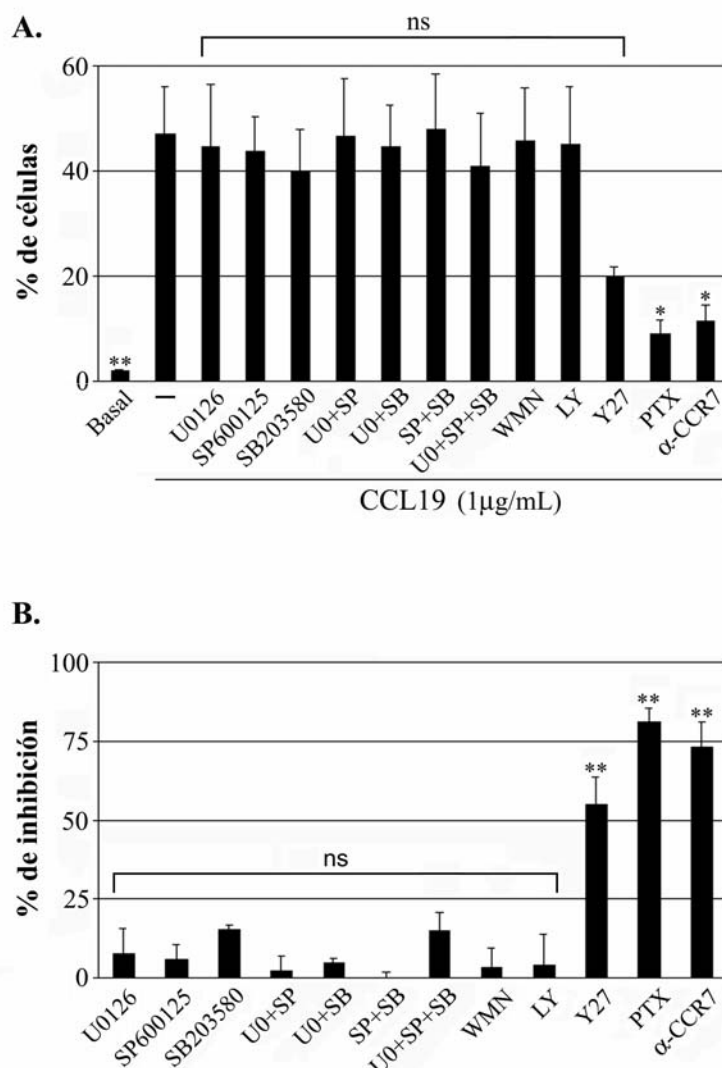


Figura 32. ROCK, pero no PI3K, regula la quimiotaxis de células B normales en respuesta a CCL19. Las células B de SP fueron aisladas mediante selección inmunomagnética positiva antes del análisis de la quimiotaxis en respuesta a CCL19 (1 $\mu\text{g/mL}$) en células control o tratadas en cámaras *Transwell*. Las células B fueron pretratadas durante 1 hora a 37°C con los inhibidores indicados. *Concentración final de los inhibidores:* 5 μM U0126, 30 μM SP600125, 20 μM SB203580, 0,5 μM wortmanina, 20 μM LY294002, y 20 μM Y-27632. El pretratamiento con PTX (100 ng/mL) y anti-CCR7 (2 $\mu\text{g/mL}$) fueron utilizados como controles de inhibición. Se representa la media aritmética y el error estándar de la media de tres experimentos independientes. **A.** Porcentaje de células que migraron. **B.** Porcentajes de inhibición de la quimiotaxis producidos por cada molécula comparado con la migración en ausencia de cualquier inhibidor. *Abreviaturas:* ns: no significativo; *: $p < 0,05$. **: $p < 0,001$.

5-DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS EN DIFERENTES NEOPLASIAS DE CÉLULAS B

La LLC-B y los linfomas no Hodgkin caracterizados por una amplia diseminación ganglionar de las células neoplásicas expresan altos niveles de CCR7, CXCR4 y CXCR5

La adhesión y la migración de células malignas son aspectos centrales en la fisiopatología de los desórdenes linfoproliferativos crónicos, ya que pueden explicar porqué algunas patologías están confinadas a un número limitado de órganos, como la tricoleucemia (HCL), y porqué otras, como la LLC-B, presentan una amplia difusión a SP y otras estructuras. Por otro lado, el microambiente dentro de la MO y los tejidos linfoides soporta la linfopoyesis, el reclutamiento y la activación de los linfocitos, y las quimioquinas producidas por las células estromales juegan un papel crucial en estos procesos. Por tanto, ya que la migración celular es probablemente un importante mecanismo para que las células malignas infiltren los GL durante la progresión de la enfermedad, el estudio de la expresión de CKR y del patrón quimiotáctico que caracteriza, no sólo a las distintas subpoblaciones de células B normales, sino también a sus equivalentes celulares malignos, puede explicar la heterogeneidad en el comportamiento migratorio y clínico de las células B neoplásicas y clarificar la patogénesis de la progresión de los SLP-B.

En concreto, en la LLC-B, en la cual se centra la mayor parte del trabajo, se habían observado las células malignas migrando a través de HEV, prominentes en los ganglios de los pacientes, pero no se sabía mucho acerca de las quimioquinas, las moléculas de adhesión o sus respectivos receptores implicados en este proceso. Antes de comenzar el trabajo, se había descrito una alta expresión del receptor CXCR3 en células de LLC-B (Trentin *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000), pero no está clara la función que podría ejercer dicho receptor en la diseminación tumoral, dado que sus ligandos (CXCL9/Mig y CXCL10/IP-10), quimiotácticos para células T activadas, no se expresan en las células endoteliales de las HEV. Y, en aquellos primeros momentos, se publicó un trabajo en el cual se analizaba la expresión de CXCR4, CXCR5, CCR5 y CCR6 en diferentes neoplasias de células B (Dürig *et al.*, 2001). En dicho estudio observaban, entre otros, una elevada expresión tanto de CXCR4 como de CXCR5 en todos los LNH de células B maduras.

CCR7 es el principal CKR implicado en la entrada de los linfocitos a tejidos linfoides secundarios. Además, CXCR4 y CXCR5 también contribuyen a la recirculación linfocitaria, jugando papeles parcialmente redundantes con el de CCR7 (Okada *et al.*, 2002; Stein y Nombela-Arrieta, 2005). Del papel de estos receptores en el *homing* linfocitario, se infería la importancia de analizar la expresión de CCR7 en neoplasias B con diferentes patrones de infiltración de GL, solo, o simultáneamente con CXCR4 y CXCR5.

La conclusión más importante de los datos obtenidos por CMF, es que la intensidad de expresión de los receptores de las principales quimioquinas homeostáticas es significativamente

mayor en aquellas neoplasias B con un patrón de amplia diseminación ganglionar, como la LLC-B, el linfoma del manto (MCL) y el folicular (FL), en comparación con neoplasias de células B que presentan poco o mínimo compromiso de los GL. Por tanto, la expresión de determinados niveles de CCR7, CXCR4 o CXCR5 funcionales podría estar garantizando la entrada de las células leucémicas a los ganglios y la diseminación que caracteriza a estas patologías. En cambio, las neoplasias de células B con niveles bajos o negativos de estos receptores podrían tener pocas posibilidades, o ninguna, de entrar en los tejidos linfoides secundarios.

Bajos o moderados niveles de estas moléculas se observaron también en precursores LAL-B de seis pacientes, de los cuales dos no presentaban linfadenopatías prominentes (datos no mostrados). Las linfadenopatías pueden estar presentes en el 20 al 45% de los pacientes con LAL-B, que expresa bajos niveles de CCR7 y CXCR5 y una expresión moderada de CXCR4 (**Ludwig *et al.*, 1998; Todeschini *et al.*, 1998; Wetzler *et al.*, 1999**). Este hecho podría ser contradictorio a la hipótesis propuesta en nuestro estudio. Sin embargo, las linfadenopatías de precursores LAL-B son rara vez llamativas, y su incidencia es mucho menor que en LLC-B, MCL o FL. Diferencias en la afinidad de los receptores o una expresión diferencial de moléculas de adhesión, entre otros, pueden explicar la incidencia de linfadenopatías en LAL-B, comparado con otros síndromes linfoproliferativos B como la HCL o el MM, los cuales presentan también una baja expresión de CCR7, CXCR4 y CXCR5. Un posible candidato para explicar estas diferencias es la molécula L-selectina (CD62L), ya que su expresión es particularmente baja en la HCL, el linfoma esplénico de la zona marginal (SMZL) y el MM, mientras que está presente en un porcentaje moderado de blastos LAL-B (**Kim *et al.*, 1994; Angelopoulou *et al.*, 1999; Drillenburger y Pals, 2000; Hara *et al.*, 2000**).

Por otra parte, la linfocitosis policlonal persistente de células B (PPBL) es una condición clínica poco frecuente caracterizada por una expansión policlonal de LB normales originarios de la zona marginal de los GL, el bazo y otros tejidos linfoides (**Salcedo *et al.*, 2002**). De forma interesante, las células B de los cuatro casos de PPBL analizados están completamente desprovistas de CCR7 y muestran una baja expresión en superficie tanto de CXCR4 como de CXCR5, un fenotipo que fuertemente recuerda al del SMZL y la HCL, sustentando la idea de que las células de dicha patología son LB procedentes del compartimento marginal.

Desde un punto de vista funcional, el patrón de expresión de CKR de las células neoplásicas se corresponde con el patrón quimiotáctico *in vitro* en respuesta a sus ligandos. Las células LLC-B, que expresan altos niveles de los tres receptores, migraron con gran eficiencia a sus ligandos. Por otra parte, **Corcione *et al.*** han mostrado cómo las células del MCL migran eficientemente a CCL19 y CXCL12, de acuerdo con la hipótesis de que CCR7 y CXCR4 están promoviendo la migración de las células tumorales y contribuyendo, de esta forma, a su potencial invasivo local (**Corcione *et al.*, 2004**). Estudiamos, asimismo, la quimiotaxis *in vitro* en respuesta a las quimioquinas en estudio de

células PPBL, LAL-B y MM y, de acuerdo a los resultados de expresión, no se observaron niveles de migración significativos a prácticamente ninguna de las quimioquinas. Solamente, de forma más reseñable, las células mielomatosas migraron de forma moderada en respuesta a CXCL12, de acuerdo a la expresión moderada en superficie de CXCR4.

Desde un punto de vista práctico, podemos señalar que la caracterización de la expresión de CKR puede representar una útil herramienta diagnóstica, por ejemplo, para diferenciar la mayoría de patologías de células B con fenotipo *naïve* de aquellas con un fenotipo de memoria. Y sobre todo, para distinguir la LLC-B atípica CD5- del SMZL, sin características fenotípicas distintivas, así como de la mayoría de síndromes linfoproliferativos B.

El patrón de expresión de receptores de quimioquinas en las neoplasias hematológicas de células B refleja el de sus supuestos equivalentes celulares normales

La alta expresión de CCR7, CXCR4 y CXCR5 observada en neoplasias de células B con un elevado nivel de linfadenopatías podría ser aberrante y estar relacionada con el proceso de transformación oncogénica o reflejar los niveles de expresión encontrados en su supuesta célula normal de origen.

En primer lugar, los precursores normales de células B expresan niveles muy bajos o negativos de CCR7 y CXCR5, y niveles moderados de CXCR4, reflejando la expresión encontrada en blastos LAL-B. En el caso de las leucemias y linfomas de células B maduras, se observó una correlación inversa entre la expresión del receptor CCR7 y el estadio de diferenciación celular. Como se ha comentado anteriormente, las células de LLC-B, MCL y FL, expresan en superficie altos niveles de CCR7, así como de CXCR5 y CXCR4, mientras que el MM es prácticamente negativo para CCR7 y CXCR5, y débilmente positivo para CXCR4. Como en el caso de los precursores, la expresión diferencial de CKR en células B maduras normales recuerda a la de las correspondientes neoplasias.

La elevada expresión de CCR7 que caracteriza tanto a algunas neoplasias de células B maduras, como células B *naïve* normales de SP, refleja su papel en la migración celular a través de HEV de la zona T de tejidos linfoides secundarios. La estimulación antigénica reprograma las células B normales para migrar, en primer lugar, hacia el límite de la zona T y, posteriormente, una vez que han interactuado con las células T CD4+ específicas del Ag, para dirigirse de nuevo hacia la zona B y formar folículos secundarios (Casamayor-Pallejà *et al.*, 2002). Estudios en ratón (Reif *et al.*, 2002) indicaban que la formación de CG, tras estimulación antigénica, requiere la disminución de la expresión de CCR7 y el mantenimiento de la alta expresión de CXCR5, en concordancia con nuestros datos obtenidos en células B de CG de amígdala y con la menor expresión de CCR7 en FL, derivado de CG, respecto al MCL, correspondiente a un estadio de célula *naïve*.

En células B posgerminales se produce la progresiva disminución de CXCR5 y CCR7, como se observa en los datos obtenidos en células plasmáticas, que junto con la expresión moderada de CXCR4, puede mediar la migración de las células B normales de memoria y plasmáticas hacia microambientes anatómicos que sustentan la supervivencia a largo plazo de estas células o hacia sitios de producción de Acs como la MO (Hargreaves *et al.*, 2001).

De los datos de CMF expuestos anteriormente, se deduce que el patrón de expresión de CKR en neoplasias B refleja el de sus supuestos equivalentes celulares normales. De todas formas, encontramos que la mayoría de muestras de LLC-B, MCL y FL expresan niveles significativamente mayores de CCR7, CXCR4 y CXCR5 que sus supuestas células de origen. Este hecho puede estar relacionado con el proceso oncogénico u otros procesos que tengan lugar en el GL tumoral, como reacciones inflamatorias o la estimulación antigénica del clon maligno. En este sentido, nuestros datos de expresión de proteínas confirman un estudio de Klein *et al.*, mostrando que los niveles de ARN mensajero de CCR7 en LLC-B son mayores que en cualquier subpoblación B normal, incluyendo células CD5+, así como células B *naïve* y de memoria (Klein *et al.*, 2001).

La mayor respuesta quimiotáctica in vitro de las células LLC-B en respuesta a CCL19 y CCL21 correlaciona con la presencia de linfadenopatía clínica en los pacientes

La LLC-B no sólo expresaba altos niveles de CCR7 en superficie, sino que además, dicho receptor era capaz de mediar la migración de las células leucémicas en ensayos de quimiotaxis *in vitro*. Aunque las células de LLC-B de todos los pacientes estudiados respondían eficazmente tanto a CCL19 como a CCL21, se observaba una gran variabilidad en los índices de migración obtenidos en cada caso. Nos planteamos si este hecho podía estar relacionado con algún factor clínico o pronóstico. Y, efectivamente, los índices de migración de las células de LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7 correlacionan significativamente con la presencia de linfadenopatía clínica en los pacientes, aunque existe cierto solapamiento entre el grupo positivo y negativo.

El mecanismo más obvio que podría estar explicando los diferentes índices de migración a los ligandos de CCR7 es la expresión diferencial del receptor. En la mayoría de los casos, los pacientes con mayor expresión de CCR7 presentan una mayor respuesta quimiotáctica *in vitro*. Sin embargo, no encontramos una correlación estadísticamente significativa entre los índices de migración o la presencia de linfadenopatía clínica y la intensidad de expresión del receptor analizado. Estos datos contrastan con los publicados por Till *et al.*, quienes mostraron que la intensidad media de fluorescencia de CCR7 correlacionaba con la presencia de un aumento clínico de los ganglios (Till *et al.*, 2002). Es posible que diferencias en el tamaño de la muestra o en los procedimientos experimentales pudieran explicar esta discrepancia. Puede ser relevante que, en nuestro caso, utilizamos un Ac conjugado con ficoeritrina, mientras que dichos autores usan una técnica de marcaje indirecto utilizando un Ac anti-CCR7 purificado revelado con una Ig anti-ratón conjugada con fluoresceína, siendo el rango de media de intensidad de fluorescencia más amplio en nuestro estudio.

De todas formas, para poder discutir mejor el solapamiento señalado entre ambos grupos, o la ausencia de correlación entre la expresión del receptor y la presencia de linfadenopatías, es importante aclarar que diseminación ganglionar y presencia de linfadenopatía clínica son conceptos relacionados pero no sinónimos. La diseminación ganglionar confirmada por examen histológico de los GL es posible en ausencia de evidencia de linfadenopatía clínica, la cual se define por un aumento del GL mayor de 1 centímetro de diámetro (**Feller y Diebold, 2003**). De hecho, los ganglios de los pacientes de LLC-B están, de forma característica, casi siempre infiltrados, pero una proporción sustancial de pacientes no muestra linfadenopatía clínica.

Por tanto, creemos que la capacidad de células LLC-B para migrar en respuesta a los ligandos de CCR7 permite a dichas células entrar en los GL, y sería responsable, al menos en parte, del marcado carácter diseminado de esta patología. Otros factores adicionales están probablemente implicados en la magnitud del tamaño tumoral y el desarrollo de linfadenopatía clínica en ciertos pacientes. Estos factores podrían incluir una expresión diferencial de las quimioquinas en los ganglios, así como diferencias en la afinidad de los receptores y en la señalización inducida por las quimioquinas, en la expresión de ciertas moléculas de adhesión en las células LLC-B, o en su tasa de proliferación. Además, hay que tener en cuenta que la mayoría de los leucocitos expresan más de un CKR de variable promiscuidad y, por tanto, son potencialmente capaces de responder a diferentes señales migratorias, no pudiendo adscribir un efecto a un único receptor. **Paoletti et al.** han visto, por ejemplo, que CXCL13 puede ejercer un efecto sinérgico con CCL19 y CCL21 aumentando la quimiotaxis inducida a través de CCR7. Sugieren que una concentración tisular suficiente de varias quimioquinas puede inducir a los leucocitos a responder a concentraciones agonistas que por sí mismas serían inactivas (**Paoletti et al., 2005**).

La diseminación tumoral es una característica de enfermedad avanzada que, de hecho, está asociada con un peor pronóstico. Por tanto, estuvimos también interesados en una posible correlación entre la capacidad quimiotáctica de células LLC-B, el estadio de la enfermedad y ciertos factores pronósticos de reciente definición en aquel momento, como la expresión de superficie de la molécula CD38 y el estado mutacional del gen para la cadena pesada de las Ig (IgV_H). Pacientes cuyas células LLC-B expresan CD38 o poseen los genes IgV_H no mutados presentan un peor pronóstico que pacientes con células CD38 negativas o genes mutados, respectivamente.

Nunca hemos encontrado una asociación significativa entre la expresión de CCR7 y el estadio de la enfermedad. Únicamente **Ghobrial et al.** describen un aumento significativo de CCR7 y CXCR4 en pacientes con estadio IV, según la clasificación de Rai, comparado con estadio 0, aunque no encuentran una asociación de la expresión con el estado mutacional de los genes IgV_H o con la expresión de CD38, al igual que en nuestro caso (**Ghobrial et al., 2004**). Ni la intensidad de expresión de CCR7, CXCR4 o CXCR5, ni los índices de migración en respuesta a sus ligandos, correlacionan con el estado mutacional o con la expresión de CD38, en concordancia con los

resultados de **Till *et al.*** Por tanto, parece improbable que haya una asociación entre la capacidad migratoria de células LLC-B y las variables biológicas causantes del peor pronóstico de pacientes con genes no mutados o células CD38+.

Parece diferente el caso de la proteína ZAP-70, cuya expresión se asocia a peor pronóstico. En el momento de la realización de este trabajo, no estaba definida la expresión de ZAP-70 como factor pronóstico en pacientes con LLC-B, de forma que no analizamos una posible relación. Pero, recientemente, **Richardson *et al.*** muestran como las LLC-B ZAP-70+ presentan niveles de expresión de CCR7 y una respuesta quimiotáctica a CCL19 y CCL21 mayores que las LLC-B ZAP-70- (**Richardson *et al.*, 2006**). Sería interesante estudiar el papel de ZAP-70 en la señalización intracelular de las células neoplásicas, dada su importancia, no sólo en LLC-B, sino también, por ejemplo, en la migración transendotelial de células T mediada por CXCL12 (**Ottoson *et al.*, 2001**; **Ticchioni *et al.*, 2002**).

Estos resultados indican que la expresión funcional de CCR7, CXCR4 y CXCR5 caracteriza a las células de la mayoría de los pacientes, definiendo un fenotipo común de LLC-B que permite a la gran mayoría de casos diseminarse al interior de tejidos linfoides secundarios con independencia de ciertos indicadores pronósticos. Si las diferencias existentes en la capacidad quimiotáctica de células LLC-B podrían constituir un factor pronóstico independiente, no puede ser concluido con los datos obtenidos, ya que se requeriría un tipo de estudio diferente.

Una conclusión de importante interés clínico es que la mayor expresión de CCR7, CXCR4 y CXCR5 observada en casi todas las muestras de LLC-B convierte a estas moléculas en dianas terapéuticas potenciales en dicha patología. En LLC-B la arquitectura normal de los ganglios está completamente obliterada por células malignas infiltrantes, lo que contribuye al defecto inmune comúnmente presente en dicha enfermedad. Además, es probable que el GL provea un ambiente favorecedor del crecimiento y supervivencia de los linfocitos malignos. Por tanto, interferir en la migración de las células LLC-B al interior de los ganglios podría tener un importante potencial terapéutico.

CCL19, pero no CCL21, induce la internalización del receptor

Muchos estudios han intentado revelar el papel diferencial de cada uno de los ligandos de CCR7 porque, ¿qué sentido fisiológico tiene la existencia de dos ligandos con funciones totalmente redundantes? Se han visto diferencias en el patrón de expresión tisular de cada uno de ellos y, además, parece que CCL21 a través de su dominio adicional C-terminal sería fundamental para el proceso de extravasación en las HEV. Pero en pocos ensayos se observa una acción diferencial. Una de las excepciones es el estudio de la internalización del receptor inducida por el ligando, fundamental para regular la actividad de las quimioquinas. En este sentido, nuestros datos indican que CCR7 es internalizado en respuesta a CCL19, pero no a CCL21, incluso en presencia de altas concentraciones

de este último. Idénticos resultados se han obtenido en células T (**Bardi *et al.*, 2001**), indicando que este efecto no es específico de una subpoblación linfoide particular. Es muy posible que este fenómeno refleje que las células que se extravasan por acción de CCL21, necesitan mantener intacta su respuesta quimiotáctica a CCL19 y CCL21 para su correcta distribución en el interior de los GL, como se ha propuesto para las células T.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA DE CÉLULAS LLC-B A LOS LIGANDOS DE CCR7

CCR7, por tanto, ejerce un papel clave, no sólo en el *homing* fisiológico de los leucocitos a tejidos linfoides secundarios, sino también en la migración metastásica de las células tumorales. Podría representar una atractiva diana para el tratamiento de la LLC-B, incurable en la actualidad, debido a sus altos niveles en las células leucémicas y a su expresión restringida a algunas subpoblaciones leucocitarias. Además, la expresión de CCR7 se ha asociado a la formación de metástasis en GL (**Zlotnik, 2004; Kakinuma y Hwang, 2006**), no sólo en neoplasias hematológicas, como la LLC-B, el linfoma del manto (**Corcione *et al.*, 2004; López-Giral *et al.*, 2004**) y folicular, la enfermedad de Hodgkin (**Höpken *et al.*, 2002**), la leucemia/linfoma de células T del adulto (**Hasegawa, 2001**) o la micosis fungoide (**Kallinich *et al.*, 2003**), sino también en tumores sólidos como el carcinoma colorrectal (**Gunther *et al.*, 2005; Schimanski *et al.*, 2005**), carcinoma gástrico (**Mashino *et al.*, 2002**), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (**Wang *et al.*, 2004**), carcinoma de células escamosas de esófago (**Ding *et al.*, 2003**), melanoma (**Müller *et al.*, 2001; Wiley *et al.*, 2001**), cáncer de células no pequeñas de pulmón (**Takanami, 2003**) y cáncer de mama (**Müller *et al.*, 2001; Cabioglu *et al.*, 2005**). Y el número de patologías aumenta continuamente.

Inhibir la función y la señalización inducida por este receptor, podría ser una útil herramienta terapéutica para inhibir el crecimiento tumoral y prevenir la formación de metástasis. Hemos desarrollado diferentes aproximaciones para alcanzar este objetivo. Por una parte, nuestro grupo de investigación ha evaluado *in vitro* la utilización de CCR7 como diana para inmunoterapia (**Alfonso-Pérez *et al.*, 2006**), demostrando la capacidad de Acs monoclonales anti-CCR7 humano para inducir la lisis dependiente de complemento de células LLC-B, sin producir niveles significativos de muerte en los linfocitos normales de los propios pacientes. Por otra parte, inhibir o modular las vías de señalización intracelulares ofrece una alternativa al desarrollo de Acs monoclonales, análogos de quimioquinas bloqueantes o a la búsqueda de pequeñas moléculas antagonistas de los CKR (**Johnson *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2006**).

Por tanto, a continuación nos planteamos estudiar las vías de señalización activadas por CCR7 en células LLC-B con el objetivo de extender nuestro conocimiento acerca de la patogénesis de la enfermedad y explorar nuevos caminos para bloquear los efectos de este receptor y controlar la progresión de la leucemia.

La actividad de la cascada de las MAPKs no es necesaria para la quimiotaxis de células LLC-B en respuesta a CCL19 y CCL21

La cascada de las MAPKs juega un papel fundamental en la quimiotaxis y la activación de integrinas mediadas tanto por quimioquinas CXC como CC. Se ha demostrado que su activación es crítica, entre otros, en la quimiotaxis inducida por CXCL12 en células T CD4+ (Vlahakis *et al.*, 2002), la quimiotaxis *in vitro* y el rodamiento *in vivo* de eosinófilos inducidos por eotaxina (Boehme *et al.*, 1999; Kampen *et al.*, 2000), la migración de monocitos (Arefieva *et al.*, 2005) y de la línea monocítica THP-1 (Ashida *et al.*, 2001) en respuesta a MCP-1 y, en particular, en la migración *in vitro* mediada por CCR7 de DCs (Ardehsna *et al.*, 2002; Scandella *et al.*, 2004; Iijima *et al.*, 2005; Riol-Blanco *et al.*, 2005). Riol-Blanco *et al.* demostraron que la unión de CCR7 a sus agonistas induce la activación de ERK1/2, JNK y p38SAPK en DCs, con ERK1/2 y p38SAPK controlando la activación de JNK. Las tres principales MAPKs estarían regulando de forma no sinérgica y dependiente de Gi la quimiotaxis de DCs dependiente de CCR7, aunque no la velocidad de migración. Por estas razones, decidimos estudiar el efecto de CCL19 y CCL21 en la cascada de las MAPKs en células LLC-B.

La estimulación de CCR7 produjo una fuerte activación de ERK1/2 dependiente de proteínas $G\alpha_i$ en todos los pacientes de LLC-B analizados, siendo CCL19 más potente que CCL21, en concordancia con estudios en una línea de células humanas de riñón embrionario transfectada con CCR7 (HEK-CCR7-FLAG) (Kohout *et al.*, 2004). Dicha activación de ERK1/2 es máxima a los 2 minutos de estimulación, al igual que sucede en DCs tras estimulación con los ligandos de CCR7. Las proteínas $G\alpha_i$ pueden activar las MAPKs de forma dependiente de Ras, pero también de forma independiente, pudiendo implicar a PI3K γ y PKC ζ (Takeda *et al.*, 1999; Curnock *et al.*, 2002). Al igual que en la fosforilación de ERK1/2 mediada por CXCR4 en LLC-B (Richardson *et al.*, 2006) o por CCR7 en DCs (Riol-Blanco *et al.*, 2005), la activación inducida por CCR7 en LLC-B se produce a través de la vía Raf/Ras/MEK/ERK1/2 de forma independiente de la actividad PI3K.

Pero, a pesar de esta potente activación, los resultados de los ensayos de quimiotaxis *in vitro* con inhibidores de ERK1/2 claramente indican que dicha quinasa no juega ningún papel en la migración de células LLC-B. Por tanto, ¿cuál podría ser potencialmente el papel de la activación de ERK1/2 en LLC-B durante la estimulación del receptor CCR7?

La LLC-B ha sido clásicamente descrita como una enfermedad de acumulación más que de proliferación, pero la LLC-B no es una enfermedad estática (Chiorazzi y Ferrarini, 2006; Soma *et al.*, 2006). En todos los pacientes se observa una amplia proliferación celular de los clones leucémicos, y en algunos, estos niveles son bastantes significativos. Presumiblemente, la generación celular se produce en centros de proliferación “pseudofoliculares” localizados en los GL y MO de los pacientes (Messmer *et al.*, 2005), mientras que raramente se detectan células en ciclo celular en SP.

Por otra parte, las células LLC-B sufren rápidamente apoptosis de forma espontánea bajo condiciones de cultivo que permiten el crecimiento de líneas de células B humanas. Estas y otras observaciones sugieren que la resistencia a la apoptosis de las células leucémicas no es intrínseca y no son inmortales, sino que requieren señales originadas a través de receptores de superficie para mantener la viabilidad. En consecuencia, el microambiente de las células leucémicas en la MO o en tejidos linfoides secundarios puede contribuir a la resistencia de la LLC-B a la apoptosis *in vivo*.

Sería interesante estudiar, en primer lugar, si las quimioquinas CCL19 o CCL21 presentes en los ganglios pueden ser un factor importante para la proliferación y supervivencia de estas células y, en este caso, si estos efectos están mediados por la activación de ERK1/2. Se ha demostrado que la estimulación de CCR7 aumenta la proliferación, entre otros, de células mesangiales humanas en el riñón (**Banas et al., 2002**) y células T *naïve* (**Flanagan et al., 2004**). Además, las señales de proliferación inducidas por CXCL12 se piensa que están mediadas a través de las vías de señalización MEK/ERK1/2 y PI3K/Akt, como se ha mostrado, por ejemplo, en líneas celulares humanas de glioblastoma (**Barbero et al., 2003**) y células primarias de meningiomas (**Bajetto et al., 2007**).

Por otra parte, se ha visto que una activación sostenida de ERK1/2 es necesaria para la supervivencia promovida por CXCL12 en LLC-B ZAP-70+ (**Richardson et al., 2006**). Y, un trabajo muy reciente, ha confirmado que las quimioquinas homeostáticas (CXCL12, CXCL13, CCL19 y CCL21) aumentan la supervivencia de las células LLC-B a través de la activación de ERK1/2 y PI3K/Akt (**Ticchioni et al., 2007**), apoyando un posible papel de ERK1/2 en la supervivencia de las células leucémicas en el interior de los GL. Asimismo, se ha visto que una pequeña proporción de células mononucleares de SP de pacientes con LLC-B puede diferenciarse en células grandes, redondas y adherentes, denominadas células *nurse-like*, que protegen a las células patológicas de la muerte celular espontánea o inducida por drogas (**Burger et al., 2000**). Sería interesante ver si estas células son capaces de producir los ligandos de CCR7.

Recientemente, se ha descrito un aumento de la producción de MMP-9 en células LLC-B inducido por CCL21 (**Redondo-Muñoz et al., 2007**) y CXCL12 (**Redondo-Muñoz et al., 2006**) y mediado por ERK1/2, así como un papel crucial de dicha quinasa y de MMP-9 en la migración dependiente de CCL21 y CXCL12 a través de Matrigel o células HUVEC. Dichos resultados estarían en clara controversia con los obtenidos por nuestro grupo. Diferencias experimentales pueden ser las responsables de dicha discrepancia. Asimismo, ERK1/2 podría ser necesario para degradar la matriz extracelular y para la migración a través de endotelio mediante la producción de MMP-9 y otras moléculas podrían requerirse para la motilidad celular.

En contraste con la gran reproducibilidad de los resultados de activación de ERK1/2 por CCL19 y CCL21, los efectos de los agonistas de CCR7 en la activación de p38SAPK y JNK son variables dependiendo del donante, consistente con la heterogeneidad que caracteriza a la biología

molecular y a los aspectos clínicos de la LLC-B. Pero a pesar de ello, al igual que en el caso de ERK1/2, p38SAPK y JNK no juegan un papel significativo en la quimiotaxis dirigida por CCR7 de células LLC-B, en contraste con el papel de ambas quinasas en la migración celular inducida por CCL19 y CCL21 en DCs, o el requerimiento de la señalización por p38SAPK para la quimiotaxis de células LAL-B en respuesta a CXCL12, entre otros (**Bendall et al., 2005**).

En todas las muestras de LLC-B analizadas se detectan tanto p38SAPK, como JNK, basalmente fosforilados. La presencia de vías de señalización constitutivamente activas es un hallazgo común en patologías hematológicas. Se ha demostrado que la activación de p38SAPK es responsable de la expresión constitutiva de MMP-9 en células LLC-B (**Ringshausen et al., 2004**), cuyos niveles elevados en el suero de los pacientes correlaciona con un pronóstico desfavorable. Pero también es bastante plausible que la activación constitutiva de p38SAPK, así como de JNK, pudiera ser responsable de la diferente capacidad de proliferación o resistencia a la apoptosis de las células leucémicas. **Ringshausen et al.** observaron igualmente cómo la inhibición de p38SAPK o de la actividad MMP-9 antagoniza la supervivencia de células LLC-B cuando se cocultivan con células estromales que las protegen de la apoptosis espontánea.

Futuros estudios podrían aclarar si diferencias en los niveles de fosforilación basal o inducidos por quimioquina de ERK1/2, p38SAPK o JNK juegan un papel en la patogénesis o en el progreso de la enfermedad. Por ejemplo, en este sentido, recientemente se ha descrito que la expresión de ERK1/2 fosforilado se asocia con factores de peor pronóstico en LAL-B y es un factor predictivo independiente de remisión completa en pacientes recién diagnosticados (**Gregorj et al., 2007**). En esta misma línea, se ha visto que los pacientes de LLC-B se pueden dividir en dos grupos en función de si responden o no al entrecruzamiento de la IgM de superficie, asociándose la ausencia de respuesta con mejor pronóstico (**Nédellec et al., 2005**). Dentro del grupo de respondedores, se distinguen casos en los que se produce proliferación celular, donde ERK1/2 es más activo relativo a p38SAPK, y en los que se induce apoptosis, donde p38SAPK predomina sobre ERK1/2, difiriendo también ambos grupos en su pronóstico.

En conclusión, el destino de las células LLC-B podría depender de un balance entre señales de supervivencia y de muerte en respuesta a diferentes estímulos, que incluirían, entre otros, la señalización a través de MAPKs y la vía PI3K/Akt. Las quimioquinas pueden activar de forma selectiva estas vías, determinando si la célula sobrevivirá o morirá, como se ha visto en el caso de CXCL12, la cual induce la supervivencia celular en células T CD4+, mientras activa señales pro-apoptóticas en neuronas (**Vlahakis et al., 2002**). De esta forma, las quimioquinas presentes en GL o bazo podrían modificar este delicado balance para favorecer la proliferación y supervivencia de las células leucémicas.

La actividad PI3K regula parcialmente la quimiotaxis *in vitro* de células LLC-B, pero no de células B normales, mediada por CCR7

La producción de PIP₃ por PI3K se encuentra sobreactivada en un amplio rango de tipos tumorales. Estos lípidos y Akt conducen a una cascada de respuestas, como la supervivencia, la motilidad, el crecimiento celular y la proliferación, que dirigen la progresión tumoral (**Vivanco y Sawyers, 2002; Fresno Vara *et al.*, 2004**).

La actividad PI3K es importante para la quimiotaxis de eosinófilos, células THP-1 y monocitos, neutrófilos, linfocitos T y B en respuesta a CCL20/MIP-3 α (**Sullivan *et al.*, 1999**), CCL2/MCP-1 (**Wain *et al.*, 2002**), CXCL8/IL-8 (**Knall *et al.*, 1997**), CXCL12 (**Vicente-Manzanares *et al.*, 1999**) y CCL5/RANTES (**Sotsios *et al.*, 1999**), y CCL3/MIP-1 α (**Rumsey *et al.*, 2001**), respectivamente, indicando que tanto receptores CC como CXC inducen la actividad PI3K. Por otra parte, la migración de DCs mediada por CCL19 y CCL21 no parece dependiente de PI3K (**Scandella *et al.*, 2004; Riol-Blanco *et al.*, 2005**), a pesar de que previamente **Ardeschna *et al.*** habían mostrado una disminución de la quimiotaxis de alrededor de un 40-50% al inhibir su actividad (**Ardeschna *et al.*, 2002**). De todas formas, la mayoría de los estudios se han realizado con los inhibidores wortmanina y LY294002, que no distinguen entre PI3K de clase IA y IB.

La importancia de cada una de las isoformas PI3K parece depender, no sólo de la quimioquina y receptor implicados, sino también del tipo celular y de su estadio de diferenciación (**Procko y McColl, 2005**). El papel de PI3K γ , estimulada por subunidades G $\beta\gamma$ de proteínas G, ha sido más profundamente estudiado, siendo particularmente relevante para la migración de neutrófilos y macrófagos (**Hirsch *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000**). Aunque los GPCR, además de p101/p110 γ , también pueden estimular isoformas p85/p110 en algunos tipos celulares. Por ejemplo, CCL2 y CCL5 estimulan p85/p110 en células THP-1 (**Turner *et al.*, 1995**) y LT (**Turner *et al.*, 1998**), respectivamente, así como CXCL12 en células mononucleares de SP (**Vicente-Manzanares *et al.*, 1999**).

De todas formas, lo más reseñable es que, en contraste con el claro requerimiento de PI3K para la migración de neutrófilos en respuesta a quimioquinas, su función en la migración transendotelial linfocitaria ha generado una gran controversia (**Ward, 2004, 2006**). Se ha descrito que la pérdida de actividad PI3K γ perjudica la diferenciación dependiente de Ag de linfocitos T y B (**Li *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000**), aunque si esto se debe a una migración deficiente a los sitios linfoides apropiados, o a un papel directo en la diferenciación linfocitaria, no está claro.

Estudios previos también mostraban cómo la inhibición de PI3K no reduce significativamente el homing linfocitario *in vivo* (**Constantin *et al.*, 2000**) o su migración transendotelial en respuesta a CXCL12 en cámaras de flujo (**Cinamon *et al.*, 2001**). En concordancia con estos estudios, nuestros resultados con células B periféricas normales indican que su quimiotaxis *in vitro* en respuesta a

CCL19 no es sensible a los inhibidores de PI3K. En la misma línea, recientemente, se ha desarrollado un sistema basado en el uso de láminas de GL para estudiar el tráfico de células T. Corroboran que, a pesar de su establecido papel en la motilidad de células mieloides, la actividad PI3K no contribuye al movimiento, fuertemente dependiente de CCR7 y sensible a PTX, de los LT en las láminas de ganglio (**Asperti-Boursin et al., 2007**). Sin embargo, otro estudio prácticamente simultáneo indica, en confrontación con el de **Asperti-Boursin et al.**, que PI3K de clase I modulan la motilidad linfocitaria basal en el interior de los GL (**Matheu et al., 2007**). De todas formas, en el sistema de láminas de GL, a pesar de que se observa que el tratamiento con wortmanina no afecta a la motilidad y velocidad de migración de los LT que alcanzan la zona T del ganglio, es cierto que una fracción de las células tratadas se acumulan en HEV, como si la inhibición de PI3K enlenteciera su entrada en los GL.

Como consecuencia del hecho de que la migración linfocitaria no parezca depender *in vivo* de la actividad PI3K, la atención se ha dirigido hacia otras vías, y especialmente, a moléculas como la proteína de anclaje DOCK2 (**Reif y Cyster, 2002**). La pequeña GTPasa Rac puede ser activada por vías dependientes de PI3K, pero también por rutas independientes que implican a DOCK2, altamente expresada en leucocitos. Estudios con ratones deficientes en DOCK2 muestran severos defectos en la migración linfocitaria en respuesta a las principales quimioquinas homeostáticas: CXCL12, CCL19, CCL21 y CXCL13, en cambio, no se afecta la migración monocitaria (**Nombela-Arrieta et al., 2004, 2007**). El desarrollo de la adquisición de DOCK2 durante la linfopoyesis, puede selectivamente desacoplar PI3K de la red reguladora del citoesqueleto de actina en el linaje linfoide, mientras que en leucocitos mieloides, los cuales no expresan DOCK2, se preserva el papel de PI3K en la regulación del citoesqueleto.

Sin embargo, dichos trabajos muestran, en ausencia de DOCK2, una migración residual dependiente de PI3K. En células T, este *homing* residual depende, principalmente, de PI3K γ , mientras que otras isoformas estarían implicadas en las células B. La wortmanina inhibe selectivamente el *homing* B, dependiente de CXCR5, a placas de Peyer y pulpa blanca del bazo por inhibición de p110 δ (**Reif et al., 2004**), isoforma que estaría implicada, por tanto, en la quimiotaxis mediada por CXCL13, pero que tampoco parece fundamental en la respuesta a CCR7 o CXCR4 (**Ward, 2006**), al igual que PI3K γ . **Matheu et al.** observan, igualmente, como la wortmanina afecta a la migración B en respuesta a CXCL13 y a su localización en los folículos, aunque otorgan un importante papel a la subunidad reguladora p85 α . Curiosamente, describen una respuesta quimiotáctica *in vitro* prácticamente nula de las células B murinas a CCL19 y CXCL12, la cual aumenta tras el pretratamiento con el inhibidor, en discrepancia con trabajos previos (**Reif et al., 2004**). En nuestro caso, las células B siempre han migrado eficientemente a ambas quimioquinas, y dicha migración no aumenta inducido por los inhibidores de PI3K. Realmente, las condiciones experimentales utilizadas en ambos casos son muy similares, a excepción del origen de las células (murino y humano) y la dosis utilizada de la quimioquina: 0,5 μ g/mL de CCL19 frente a 1 μ g/mL en nuestro caso, pero experimentos dosis-

respuesta demostraron que también migran a dosis inferiores, aunque a menor nivel. En el caso de CXCL12, la dosis utilizada en dicho trabajo fue incluso cinco veces superior a la nuestra, de forma que no están claras las razones de dicha discrepancia.

Por otra parte, los experimentos de migración con inhibidores o con las formas mutantes de la PI3K muestran un papel crucial de PI3K en la quimiotaxis de células LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7, confirmando que las principales moléculas que regulan la migración celular *in vivo* de las células leucémicas podrían no reflejar aquellas que regulan la quimiotaxis de sus equivalentes celulares normales.

Es cierto que concentraciones por encima de 100 nM de wortmanina o 10 μ M de LY294002 pueden inhibir otras enzimas incluyendo PI3K de clase II, III o PI4Ks (**Balla y Balla, 2006**). Pero hemos comprobado como dosis bajas de wortmanina, de 50 a 100 nM, inhiben también la quimiotaxis de células LLC-B dependiente de CCR7, si bien es cierto que dosis más elevadas ejercen una mayor inhibición. Por tanto, PI3K diferentes a clase I podrían estar implicadas. Sin embargo, aunque no se puede excluir un papel de clase II o III, estas enzimas, a diferencia de clase I, no generan PIP₃, que regulan la motilidad celular en varios tipos celulares. En conclusión, sería necesario un estudio más extenso para determinar las isoformas concretas de PI3K requeridas.

Akt/PKB, efector de PI3K, tiene un papel central en las vías de supervivencia mediadas por quimioquinas en muchos sistemas celulares, incluyendo los linfocitos, además de su implicación en procesos de migración celular. CCR7 transduce señales que protegen a las DCs (**Sánchez-Sánchez et al., 2004**) y a LT CD8+CCR7+ de la apoptosis (**Kim et al., 2005**), a través de la vía PI3K/Akt. **Ringshausen et al.** demostraron que la vía PI3K está constitutivamente activa en células de LLC-B, lo que podría explicar la apoptosis reducida de estas células, aunque no detectan Akt constitutivamente fosforilado (**Ringshausen et al., 2002**). Sin embargo, en nuestro caso, detectamos en todas las muestras de LLC-B analizadas una fosforilación basal de Akt, la cual aumenta después de estimular con los ligandos de CCR7. **Barragán et al.** también observan una fosforilación basal de Akt en células LLC-B frescas, implicada en su supervivencia (**Barragan et al., 2002**), que puede producirse por dos vías diferentes, PI3K y PKC β , de forma que los inhibidores de PI3K no bloquean la fosforilación basal en parte de los casos analizados (**Barragan et al., 2006**). En cambio, indican que la fosforilación de Akt inducida por CXCL12 es dependiente de PI3K. Este hecho podría explicar el que, en las muestras de LLC-B analizadas, no se inhiba siempre la fosforilación basal con wortmanina y LY294002, pero sí la inducida por CCL19.

Por tanto, la señalización a través del CCR7 podría influenciar la resistencia a la apoptosis de células LLC-B en los tejidos linfoides secundarios a través de esta vía en una estrecha relación con las señales de supervivencia y muerte de las MAPKs.

La migración de células LLC-B en respuesta a CCL19 y CCL21 está regulada por ROCK

Está claramente demostrado el papel de la familia Rho de pequeñas GTPasas en migración y polarización celular (**Fukata et al., 2003**). Los ensayos de quimiotaxis *in vitro* mostraron que la inhibición de ROCK, efector de la pequeña GTPasa Rho, produce un fuerte descenso de la migración de LLC-B hacia los ligandos de CCR7, como se ha visto en LT (**Bardi et al., 2003**) y DCs (**Scandella et al., 2004; Iijima et al., 2005**), aunque **Riol-Blanco et al.** demuestran que Rho controla la velocidad de migración analizada por videomicroscopía, incluso en ausencia de quimioquina, pero no la quimiotaxis mediada por CCR7 de DCs en ensayos de *Transwell* (**Riol-Blanco et al., 2005**).

Dado el papel central que jugaba la vía Rho/ROCK en la migración de células LLC-B, nos propusimos comprobar si la estimulación de CCR7 en dichas células inducía un aumento de la actividad de las pequeñas GTPasas de la familia Rho mediante ensayos de *pull-down* utilizando las proteínas de fusión GST-C21 y GST-PAK que reconocen, respectivamente, RhoA y Rac/Cdc42 activos. Pero los datos obtenidos no fueron concluyentes, no tanto por los resultados, sino por la dificultad para demostrar la reproducibilidad de éstos. Debido, por un lado, a problemas técnicos, y por otro, a la limitación de la repetición del experimento por la dificultad para obtener muestras de SP con un número suficiente de células patológicas para la realización del ensayo, decidimos no mostrar estos resultados. De todas formas, los resultados provisionales de los ensayos de *pull-down* muestran una activación de la pequeña GTPasa RhoA por CCL19, con un pico de activación a los 5 minutos. Asimismo, se observa un aumento de la actividad de Cdc42 mediada por CCR7, como se ha visto también en DCs maduras (**Yanagawa y Onoe, 2002**). En cambio, de forma reproducible, no se observa una activación de Rac en LLC-B ni por CCL19 ni por CCL21. Estos resultados se encontrarían en la misma línea que los obtenidos por **Vicente-Manzanares et al.** en linfocitos de SP donde observan que CXCL12 activa RhoA pero no Rac, demostrando que la inhibición en diferentes pasos de la cascada de señalización Rho-ROCK-MLCK (quinasa de la cadena ligera de la miosina) bloquea la quimiotaxis linfocitaria en respuesta a CXCL12 (**Vicente-Manzanares et al., 2002**).

Asimismo, sería interesante estudiar el posible papel de la familia de pequeñas GTPasas Rap en la migración de células LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7. Diversos trabajos han implicado a la proteína Rap-1 en la activación de integrinas, la polarización celular y la motilidad a través del endotelio bajo condiciones de flujo (**Kinashi y Katagiri, 2004**). CXCL12 induce la activación de Rap1 en células B, y su bloqueo inhibe *in vitro* la quimiotaxis en respuesta a la quimioquina (**McLeod et al., 2002, 2004**). Y, de forma interesante, se ha visto cómo Rap1 juega un papel clave en la activación de integrinas y la migración transendotelial linfocitaria en condiciones de flujo inducidas, no sólo por CXCL12, sino también por CCL21 (**Shimonaka et al., 2003**). Otros autores han visto cómo la quimiotaxis linfocitaria mediada por CXCR3 y CCR4, independiente de PI3K, está regulada por una vía dependiente de PLC (**Smit et al., 2003; Ward, 2004**). Esta vía podría

implicar a Rap, ya que existen GEFs regulados por calcio y DAG (CalDAG-GEFs), generado durante la activación de PLC, que pueden funcionar como factores de intercambio para Rap.

De esta forma, sería interesante estudiar el papel de las familias de pequeñas GTPasas Rho y Rap, así como de DOCK2, en la quimiotaxis inducida por CCR7 en células tumorales.

En conclusión, la alta expresión de los receptores de las principales quimioquinas homeostáticas puede estar determinando el carácter diseminado de diversas patologías, como la LLC-B, donde la elevada expresión de CCR7 convierte a dicha molécula en una óptima diana terapéutica para, no sólo intentar eliminar las células tumorales, sino también bloquear la migración celular a los GL. Por otra parte, nuestros resultados muestran un papel crucial de PI3K y ROCK, pero no de las MAPKs, en la migración mediada por CCR7 de células LLC-B. Las MAPKs podrían ser determinantes para producir señales de supervivencia, muerte o proliferación en células LLC-B en respuesta a quimioquinas homeostáticas (ver modelo en figura 33). Además, las principales moléculas implicadas en la quimiotaxis inducida por CCR7 son diferentes en LLC-B, DCs y células B y T normales, sustentando la idea de que las principales cascadas de señalización que median la migración inducida por quimioquinas son dependientes del contexto celular. Las quimioquinas pueden activar las mismas moléculas en distintas células, pero en función de qué tipo celular se trate, o incluso de su estadio, estas moléculas pueden contribuir de forma diferencial a la actividad quimiotáctica, e incluso activarse por diferentes vías. A modo de ejemplo, CCL19 y CCL21 son capaces de activar las tres principales MAPKs en LLC-B y DCs, con ERK1/2 y p38SAPK controlando JNK en DCs, mientras que la activación de JNK es independiente en LLC-B. Por otra parte, es innegable el hecho de que todas estas moléculas de señalización forman una compleja red de interconexiones en el interior celular y ninguna es única responsable de una determinada respuesta.

Futuros estudios son necesarios para dilucidar las vías de señalización activadas por CCR7, no sólo en el caso de LLC-B, sino también en otras células tumorales caracterizadas por la expresión de dicho receptor, y cómo las diferentes moléculas interactúan, para entender mejor los mecanismos moleculares que median la migración tumoral a los GL, así como su proliferación y su resistencia a la apoptosis. Estos conocimientos podrían abrir nuevas vías para la búsqueda de terapias para las enfermedades neoplásicas.

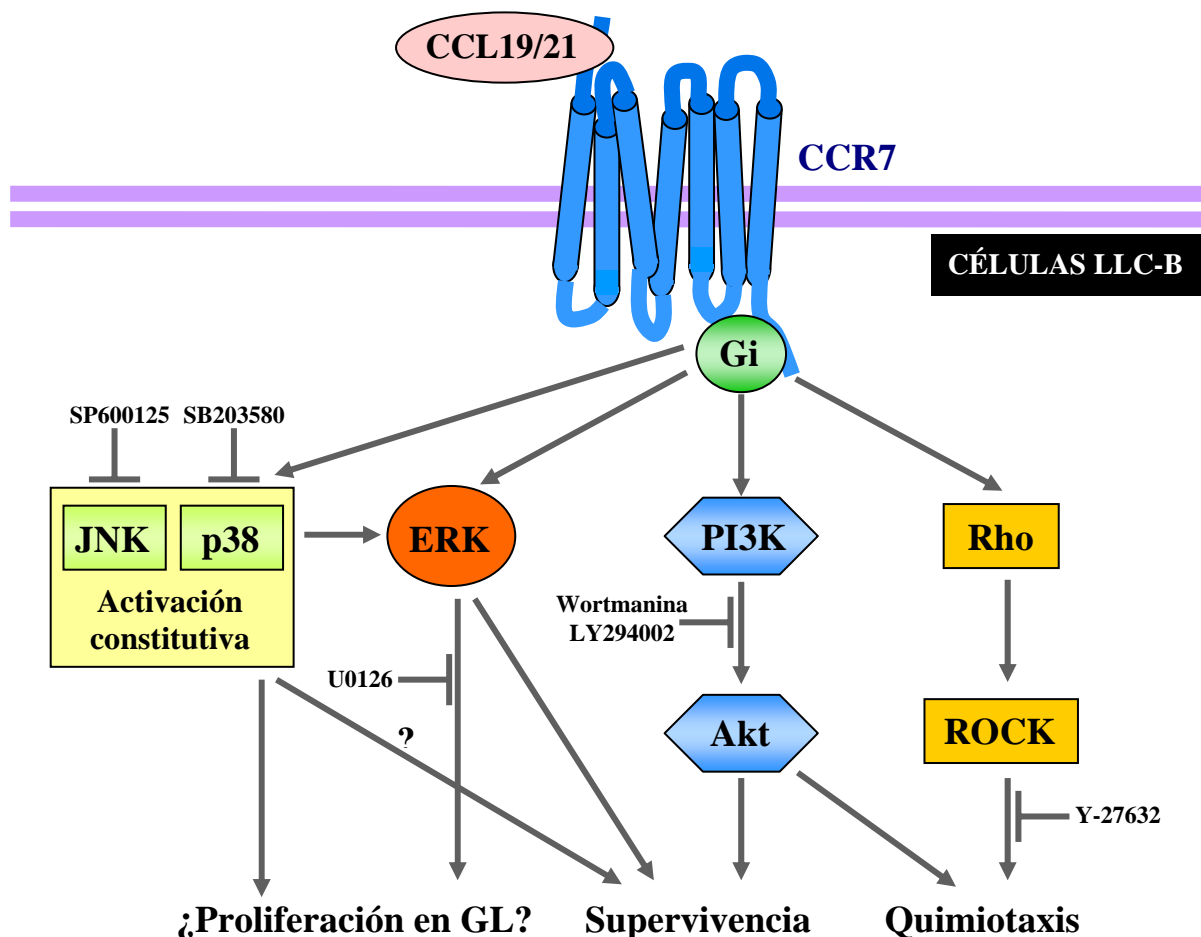


Figura 33. Modelo propuesto para la señalización intracelular inducida por el receptor CCR7 en LLC-B. La unión de CCL19 y CCL21 a su receptor, en células de LLC-B, produce la activación de ROCK, que junto con la vía PI3K/Akt, regulan la quimiotaxis celular mediada por CCR7. PI3K está constitutivamente activada en LLC-B, relacionado con la resistencia celular a la apoptosis (Ringshausen *et al.*, 2002). Se observa un bajo nivel de Akt fosforilado en células no estimuladas, que aumenta tras tratamiento con CCL19 y CCL21. Las quimioquinas producen una fuerte activación de ERK1/2, pero esta quinasa no juega ningún papel en la quimiotaxis de las células LLC-B. La potente activación de ERK1/2 puede estar relacionada con la proliferación o supervivencia (Ticchioni *et al.*, 2007) de las células leucémicas en GL. La activación de ERK1/2 es dependiente de proteínas Gi y p38SAPK, pero no de la actividad PI3K. p38SAPK y JNK están constitutivamente activadas, aumentando su estado de fosforilación tras estimulación con CCL19 y CCL21, aunque la intensidad de dicho efecto es variable dependiendo del donante. En cualquier caso, ninguna de estas quinasas es fundamental para la migración celular. De forma similar a ERK1/2, p38SAPK y JNK pueden estar jugando un papel en la apoptosis y proliferación de células LLC-B.

6-CONCLUSIONES

1. La intensidad de expresión de los receptores de las principales quimioquinas homeostáticas (CCR7, CXCR4 y CXCR5) es significativamente mayor en neoplasias B con un patrón de amplia diseminación ganglionar, como la LLC-B, el linfoma del manto y el linfoma folicular, que en aquellas patologías que presentan poco o mínimo compromiso de los ganglios linfáticos, como el linfoma esplénico de la zona marginal, la tricoleucemia y el mieloma múltiple. Por tanto, el nivel de expresión de determinados receptores de quimioquinas puede condicionar la capacidad de metastatización de las neoplasias de células B.
2. El patrón de expresión de receptores de quimioquinas de las leucemias y linfomas de células B refleja el de sus supuestos equivalentes celulares normales.
3. Desde un punto de vista funcional, el patrón de expresión de receptores de quimioquinas de las diferentes patologías de células B se corresponde con el patrón quimiotáctico celular *in vitro* en respuesta a sus ligandos.
4. La mayor capacidad quimiotáctica *in vitro* de células LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7 correlaciona con la presencia de linfadenopatía clínica en los pacientes.
5. Ni la capacidad quimiotáctica, ni la expresión de superficie de CCR7 en las células LLC-B correlaciona con diversos factores pronósticos como la expresión de CD38 o la presencia/ausencia de mutaciones en los genes que codifican para la cadena pesada de las inmunoglobulinas.
6. La caracterización del patrón de expresión de receptores de quimioquinas puede representar una útil herramienta diagnóstica, sobre todo, para la distinción de la LLC-B CD5- atípica de otros síndromes linfoproliferativos B como, por ejemplo, el linfoma esplénico de la zona marginal.
7. En células LLC-B, los ligandos de CCR7 inducen una fuerte activación de ERK1/2 independiente de PI3K y regulada por proteínas $G\alpha_i$, p38SAPK y, en menor medida, por la actividad de JNK.
8. En células LLC-B, las quimioquinas CCL19 y CCL21 ejercen un efecto variable sobre la fosforilación constitutiva de p38SAPK y JNK dependiente del donante, siendo lo más frecuente un aumento moderado de la actividad de dichas quinasas.
9. La quimiotaxis de células LLC-B en respuesta a los ligandos de CCR7 es independiente de la actividad de la cascada de las MAPKs y está regulada, al menos en parte, por las vías PI3K y Rho/ROCK.

10. La vía de señalización Rho/ROCK, pero no PI3K/Akt, regula la quimiotaxis dependiente de CCL19 en células B normales de sangre periférica. Por tanto, las principales moléculas que regulan la migración celular *in vivo* de las células leucémicas podrían no reflejar aquellas que regulan la quimiotaxis de sus equivalentes celulares normales.

7-BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A.K. y Lichtman A.H. *Inmunología celular y molecular*. 5ª ed. Madrid: Elsevier España, S.A.;2003.
2. Abbott B.L. Advances in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol* 2005; **23**:34-40.
3. Alfonso-Pérez M., López-Giral S., Quintana N.E., Loscertales J., Martín-Jiménez P. y Muñoz C. Anti-CCR7 monoclonal antibodies as a novel tool for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *J Leukoc Biol* 2006; **79**:1157-65.
4. Allen S.J., Crown S.E. y Handel T.M. Chemokine: Receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**:787-820.
5. Angelopoulou M.K., Kontopidou F.N. y Pangalis G.A. Adhesion molecules in B-chronic lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol* 1999; **36**:178-97.
6. Ardeshtna K.M., Pizzey A.R., Walker S.J., Devereux S. y Khwaja A. The upregulation of CC chemokine receptor 7 and the increased migration of maturing dendritic cells to macrophage inflammatory protein 3 β and secondary lymphoid chemokine is mediated by the p38 stress-activated protein kinase pathway. *Br J Haematol* 2002; **119**:826-9.
7. Arefieva T.I., Kukhtina N.B., Antonova O.A. y Krasnikova T.L. MCP-1-stimulated chemotaxis of monocytic and endothelial cells is dependent on activation of different signaling cascades. *Cytokine* 2005; **31**:439-45.
8. Ashida N., Arai H., Yamasaki M. y Kita T. Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemokines. *J Biol Chem* 2001; **276**:16555-60.
9. Ashwell J.D. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**:532-40.
10. Asperti-Boursin F., Real E., Bismuth G., Trautmann A. y Donnadieu E. CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. *J Exp Med* 2007; **204**:1167-79.
11. Badr G., Borhis G., Treton D., Moog C., Garraud O. y Richard Y. HIV type 1 glycoprotein 120 inhibits human B cell chemotaxis to CXC chemokine ligand (CXCL)12, CC chemokine ligand (CCL)20, and CCL21. *J Immunol* 2005; **175**:302-10.
12. Baekkevold E.S., Yamanaka T., Palframan R.T., Carlsen H.S., Reinholt F.P., von Andrian U.H., *et al.* The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* 2001; **193**:1105-12.
13. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; **392**:565-68.
14. Bajetto A., Barbieri F., Pattarozzi A., Dorcaratto A., Porcile C., Ravetti J.L., *et al.* CXCR4 and SDF1 expression in human meningiomas: a proliferative role in tumoral meningotheial cells in vitro. *Neuro Oncol* 2007; **9**:3-11.
15. Balla A. y Balla T. Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol* 2006; **16**:351-61.

16. Banas B., Wornle M., Berger T., Nelson P.J., Cohen C.D., Kretzler M., *et al.* Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis. *J Immunol* 2002; **168**:4301-7.
17. Barbero S., Bonavia R., Bajetto A., Porcile C., Pirani P., Ravetti J.L., *et al.* Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res* 2003; **63**:1969-74.
18. Bardi G., Lipp M., Baggiolini M. y Loetscher P. The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC. *Eur J Immunol* 2001; **31**:3291-7.
19. Bardi G., Niggli V. y Loetscher P. Rho kinase is required for CCR7-mediated polarization and chemotaxis of T lymphocytes. *FEBS Lett* 2003; **542**:79-83.
20. Barragan M., Bellosillo B., Campas C., Colomer D., Pons G. y Gil J. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2002; **99**:2969-76.
21. Barragan M., de Frias M., Iglesias-Serret D., Campas C., Castano E., Santidrian A.F., *et al.* Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C{beta}. *J Leukoc Biol* 2006; **80**:1473-9.
22. Bendall L.J., Baraz R., Juarez J., Shen W. y Bradstock K.F. Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1alpha in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005; **65**:3290-8.
23. Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piquet H., Goasquen J., *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; **48**:198-206.
24. Birkenbach M., Josefsen K., Yalamanchili R., Lenoir G. y Kieff E. Epstein-Barr virus-induced genes: first lymphocyte-specific G protein-coupled peptide receptors. *J Virol* 1993; **67**:2209-20.
25. Boehme S.A., Sullivan S.K., Crowe P.D., Santos M., Conlon P.J., Sriramaraio P., *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinase regulates eotaxin-induced eosinophil migration. *J Immunol* 1999; **163**:1611-8.
26. Bondev A., Rubio I. y Wetzker R. Differential regulation of lipid and protein kinase activities of phosphoinositide 3-kinase gamma in vitro. *Biol Chem* 1999; **380**:1337-40.
27. Bowman E.P., Campbell J.J., Soler D., Dong Z., Manlongat N., Picarella D., *et al.* Development switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. *J Exp Med* 2000; **191**:1303-17.
28. Bromley S.K., Thomas S.Y. y Luster A.D. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol* 2005; **6**:895-901.
29. Burger J.A., Tsukada N., Burger M., Zvaifler N.J., Dell'Aquila M. y Kipps T.J. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000; **96**:2655-63.

30. Cabioglu N., Yazici M.S., Arun B., Broglio K.R., Hortobagyi G.N., Price J.E., *et al.* CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:5686-93.
31. Cabrera-Vera T.M., Vanhauwe J., Thomas T.O., Medkova M., Preininger A., Mazzoni M.R., *et al.* Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 2003; **24**:765-81.
32. Campbell J.J., Bowman E.P., Murphy K., Youngman K.R., Siani M.A., Thompson D.A., *et al.* 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J Cell Biol* 1998; **141**:1053-9.
33. Carlsen H.S., Haraldsen G., Brandtzaeg P. y Baekkevold E.S. Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood* 2005; **106**:444-6.
34. Casamayor-Pallejà M., Mondière P., Verschelde C., Bella C. y Defrance T. BCR ligation reprograms B cells for migration to the T zone and B-cell follicle sequentially. *Blood* 2002; **99**:1913-21.
35. Chiorazzi N., Rai K.R. y Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; **352**:804-15.
36. Chiorazzi N. y Ferrarini M. Evolving view of the in-vivo kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Hematology* 2006; **2006**:273-8.
37. Cinamon G., Shinder V. y Alon R. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol* 2001; **2**:515-22.
38. Constantin G., Majeed M., Giagulli C., Piccio L., Kim J.Y., Butcher E.C., *et al.* Chemokines trigger immediate $\beta 2$ integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 2000; **13**:759-69.
39. Corcione A., Arduino N., Ferretti E., Raffaghello L., Roncella S., Rossi D., *et al.* CCL19 and CXCL12 trigger in vitro chemotaxis of human mantle cell lymphoma B cells. *Clin Cancer Res* 2004; **10**:964-71.
40. Crespo M., Bosch F., Villamor N., Bellosillo B., Colomer D., Rozman M., *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; **348**:1764-75.
41. Curnock A.P., Logan M.K. y Ward S.G. Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology* 2002; **105**:125-36.
42. Curnock A.P. y Ward S.G. Development and characterisation of tetracycline-regulated phosphoinositide 3-kinase mutants: assessing the role of multiple phosphoinositide 3-kinases in chemokine signaling. *J Immunol Methods* 2003; **273**:29-41.
43. Cutrona G., Colombo M., Matis S., Reverberi D., Dono M., Tarantino V., *et al.* B lymphocytes in humans express ZAP-70 when activated in vivo. *Eur J Immunol* 2006; **36**:558-69.
44. Cyster J.G. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**:127-59.

45. Damas J.K., Smith C., Oie E., Fevang B., Halvorsen B., Waehre T., *et al.* Enhanced expression of the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in clinical and experimental atherosclerosis: possible pathogenic role in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**:614-20.
46. Damle R.N., Wasil T., Fais F., Ghiotto F., Valetto A., Allen S.L., *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**:1840-7.
47. Damle R.N., Ghiotto F., Valetto A., Albesiano E., Fais F., Yan X.-J., *et al.* B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002; **99**:4087-93.
48. Debes G.F., Arnold C.N., Young A.J., Krautwald S., Lipp M., Hay J.B., *et al.* Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat Immunol* 2005; **6**:889-94.
49. Del Poeta G., Maurillo L., Venditti A., Buccisano F., Epiceno A.M., Capelli G., *et al.* Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**:2633-9.
50. Ding Y., Shimada Y., Maeda M., Kawabe A., Kaganoi J., Komoto I., *et al.* Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; **9**:3406-12.
51. Dong C., Davis R.J. y Flavell R.A. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**:55-72.
52. Driltenburg P. y Pals S.T. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood* 2000; **95**:1900-10.
53. Dürig J., Schmucker U. y Duhrsen U. Differential expression of chemokine receptors in B cell malignancies. *Leukemia* 2001; **15**:752-6.
54. Ehrenreiter K., Piazzolla D., Velamoor V., Sobczak I., Small J.V., Takeda J., *et al.* Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. *J Cell Biol* 2005; **168**:955-64.
55. Etienne-Manneville S. y Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; **420**:629-35.
56. Evans L.S. y Hancock B.W. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2003; **362**:139-46.
57. Feller A.C. y Diebold J. Histopathology of nodal and extranodal non-Hodgkin's lymphomas. 3^a ed. Germany: Springer;2003.
58. Fernández-Rañada de la Gándara J.M. y Alegre Amor A. Terapia en Oncohematología. 3^a ed. Madrid: Elsevier España S.A.;2005.
59. Flanagan K., Moroziewicz D., Kwak H., Horig H. y Kaufman H.L. The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4⁺ T cells. *Cell Immunol* 2004; **231**:75-84.
60. Förster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Müller I., Wolf E., *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; **99**:23-33.

61. Fresno Vara J.A., Casado E., de Castro J., Cejas P., Belda-Iniesta C. y González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004; **30**:193-204.
62. Frost J.A., Xu S., Hutchison M.R., Marcus S. y Cobb M.H. Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol Cell Biol* 1996; **16**:3707-13.
63. Fukata M., Nakagawa M. y Kaibuchi K. Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**:590-7.
64. Fukui Y., Hashimoto O., Sanui T., Oono T., Koga H., Abe M., *et al.* Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* 2001; **412**:826-31.
65. Garside P., Ingulli E., Merica R.R., Johnson J.G., Noelle R.J. y Jenkins M.K. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998; **281**:96-9.
66. Gerard C. y Rollins B.J. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; **2**:108-15.
67. Ghobrial I.M., Bone N.D., Stenson M.J., Novak A., Hedin K.E., Kay N.E., *et al.* Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. *Mayo Clin Proc* 2004; **79**:318-25.
68. Grabovsky V., Dwir O. y Alon R. Endothelial chemokines destabilize L-selectin-mediated lymphocyte rolling without inducing selectin shedding. *J Biol Chem* 2002; **277**:20640-50.
69. Gregorj C., Ricciardi M.R., Petrucci M.T., Scerpa M.C., De Cave F., Fazi P., *et al.* ERK1/2 phosphorylation is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; **109**:5473-6.
70. Gunn M.D., Tangemann K., Tam C., Cyster J.G., Rosen S.D. y Williams L.T. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naïve T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**:258-63.
71. Gunn M.D., Kyuwa S., Tam C., Kakiuchi T., Matsuzawa A., Williams L.T., *et al.* Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 1999; **189**:451-60.
72. Gunther K., Leier J., Henning G., Dimmler A., Weissbach R., Hohenberger W., *et al.* Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. *Int J Cancer* 2005; **116**:726-33.
73. Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D.G. y Stevenson F.K. Unmutated IgVH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**:1848-54.
74. Hanada M., Feng J. y Hemmings B.A. Structure, regulation and function of PKB/AKT -a major therapeutic target. *Biochem Biophys Acta* 2004; **1697**:3-16.
75. Hara J., Matsuda Y., Fujisaki H., Tokimasa S., Ohta H., Osagi Y., *et al.* Expression of adhesion molecules in childhood B-lineage-cell neoplasms. *Int J Hematol* 2000; **72**:69-73.

76. Hardtke S., Ohl L. y Förster R. Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood* 2005; **106**:1924-31.
77. Hargreaves D.C., Hyman P.L., Lu T.T., Ngo V.N., Bidgol A., Suzuki G., *et al.* A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 2001; **194**:45-56.
78. Harris N.L., Jaffe E.S., Stein H., Banks P.M., Chan J.K.C., Cleary M.L., *et al.* A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; **84**:1361-92.
79. Harris N.L., Stein H., Coupland S.E., Hummel M., Favera R.D., Pasqualucci L., *et al.* New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology* 2001; **2001**:194-220.
80. Hasegawa H. Increased chemokine receptor expression and the infiltration of lymphoid organs. *Leuk Lymphoma* 2001; **42**:1221-8.
81. Hedrick J.A. y Zlotnik A. Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines. *J Immunol* 1997; **159**:1589-93.
82. Hirsch E., Katanaev V.L., Garlanda C., Azzolino O., Pirola L., Silengo L., *et al.* Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ in inflammation. *Science* 2000; **287**:1049-53.
83. Höpken U.E., Foss H.D., Meyer D., Hinz M., Leder K., Stein H., *et al.* Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs. *Blood* 2002; **99**:1109-16.
84. Huang C., Jacobson K. y Schaller M.D. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 2004; **117**:4619-28.
85. Ibrahim S., Keating M., Do K.A., O'Brien S., Huh Y.O., Jilani I., *et al.* CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**:181-6.
86. Iijima N., Yanagawa Y., Clingan J.M. y Onoe K. CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells. *Int Immunol* 2005; **17**:1201-12.
87. Janeway C.A., Travers P., Walport M. y Capra J.D. *Inmunobiología*. 4ª ed. Barcelona: Ed. Masson;2000.
88. Johnson Z., Power C.A., Weiss C., Rintelen F., Ji H., Ruckle T., *et al.* Chemokine inhibition - why, when, where, which and how? *Biochem Soc Trans* 2004; **32**:366-77.
89. Jones D., Benjamin R.J., Shahsafaei A. y Dorfman D.M. The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; **95**:627-32.
90. Kakinuma T. y Hwang S.T. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 2006; **79**:639-51.

91. Kallinich T., Muche J.M., Qin S., Sterry W., Audring H. y Krocze R.A. Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* 2003; **121**:1045-52.
92. Kampen G.T., Stafford S., Adachi T., Jinquan T., Quan S., Grant J.A., *et al.* Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood* 2000; **95**:1911-7.
93. Kehrl J.H. Chemoattractant receptor signaling and the control of lymphocyte migration. *Immunol Res* 2006; **34**:211-27.
94. Kim I., Uchiyama H., Chauan D. y Anderson K.C. Cell surface expression and functional significance of adhesion molecules on human myeloma-derived cell lines. *Br J Haematol* 1994; **87**:483-93.
95. Kim J.W., Ferris R.L. y Whiteside T.L. Chemokine C receptor 7 expression and protection of circulating CD8+ T lymphocytes from apoptosis. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:7901-10.
96. Kinashi T. y Katagiri K. Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule, RAPL. *Immunol Lett* 2004; **93**:1-5.
97. Kinashi T. Intracellular signaling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:546-59.
98. Klein U., Tu Y., Stolovitzky G.A., Mattioli M., Cattoretti G., Husson H., *et al.* Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; **194**:1625-38.
99. Knall C., Worthen G.S. y Johnson G.L. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:3052-7.
100. Kohout T.A., Nicholas S.L., Perry S.J., Reinhart G., Junger S. y Struthers R.S. Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem* 2004; **279**:23214-22.
101. Kokhaei P., Palma M., Mellstedt H. y Choudhury A. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol* 2005; **16**:ii113-23.
102. Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**:827-37.
103. Krens S.F., Spaik H.P. y Snaar-Jagalska B.E. Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett* 2006; **580**:4984-90.
104. Laudanna C., Mochly-Rosen D., Liron T., Constantin G. y Butcher E.C. Evidence of ζ protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *J Biol Chem* 1998; **279**:30306-15.

105. Laurence D.J. Location, movement and survival: the role of chemokines in haematopoiesis and malignancy. *Br J Haematol* 2005; **132**:255-67.
106. Le Good J.A., Ziegler W.H., Parekh D.B., Alessi D.R., Cohen P. y Parker P.J. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 1998; **281**:2042-5.
107. Li Z., Jiang H., Xie W., Zhang Z., Smrcka A.V. y Wu D. Roles of PLC- β 2 and - β 3 and PI3K γ in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 2000; **287**:1046-9.
108. Liang Z., Wu T., Lou H., Yu X., Taichman R.S., Lau S.K., *et al.* Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res* 2004; **64**:4302-8.
109. López-Giral S., Quintana N.E., Cabrerizo M., Alfonso-Pérez M., Sala-Valdés M., De Soria V.G., *et al.* Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol* 2004; **76**:462-71.
110. López-Ilasaca M., Crespo P., Pellici P.G., Gutkind J.S. y Wetzker R. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase γ . *Science* 1997; **275**:394-7.
111. Ludwig W., Rieder H., Bartram C.R., Heinze B., Schwartz S., Gassman W., *et al.* Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of the german multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. *Blood* 1998; **92**:1898-909.
112. Malliri A. y Collard J.G. Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**:583-9.
113. Marinissen M.J. y Gutkind J.S. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 2001; **22**:368-76.
114. Mashino K., Sadanaga N., Yamaguchi H., Tanaka F., Ohta M., Shibuta K., *et al.* Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2002; **62**:2937-41.
115. Matheu M.P., Deane J.A., Parker I., Fruman D.A. y Cahalan M.D. Class IA phosphoinositide 3-kinase modulates basal lymphocyte motility in the lymph node. *J Immunol* 2007; **179**:2261-9.
116. Matloubian M., Lo C.G., Cinamon G., Lesneski M.J., Xu Y., Brinkmann V., *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004; **427**:355-60.
117. McLeod S.J., Li A.H.Y., Lee R.L., Burgess A.E. y Gold M.R. The Rap GTPases regulate B cell migration toward the chemokine stromal cell-derived factor-1 (CXCL12): potential role for Rap2 in promoting B cell migration. *J Immunol* 2002; **169**:1365-71.
118. McLeod S.J., Shum A.J., Lee R.L., Takei F. y Gold M.R. The Rap GTPases regulate integrin-mediated adhesion, cell spreading, actin polymerization, and Pyk2 tyrosine phosphorylation in B lymphocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**:12009-19.

119. Messmer B.T., Messmer D., Allen S.L., Kolitz J.E., Kudalkar P., Cesar D., *et al.* In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005; **115**:755-64.
120. Miller M.J., Safrina O., Parker I. y Cahalan M.D. Imaging the single cell dynamics of CD4⁺ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med* 2004; **200**:847-56.
121. Molon B., Gri G., Bettella M., Gómez-Moutón C., Lanzavecchia A., Martínez-A C., *et al.* T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 2005; **6**:465-71.
122. Moser B., Wolf M., Walz A. y Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004; **25**:75-84.
123. Müller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M.E., *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; **410**:50-6.
124. Müller G., Höpken U.E. y Lipp M. Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors. *J Leukoc Biol* 2002; **72**:1-8.
125. Murakami T., Maki W., Cardones A.R., Fang H., Tun Kyi A., Nestle F.O., *et al.* Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res* 2002; **62**:7328-34.
126. Nagira M., Imai T., Hieshima K., Kusuda J., Ridanpää M., Takagi S., *et al.* Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13. *J Biol Chem* 1997; **272**:19518-24.
127. Nédellec S., Renaudineau Y., Bordron A., Berthou C., Porakishvili N., Lydyard P.M., *et al.* B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Immunol* 2005; **174**:3749-56.
128. Neel N.F., Schutyser E., Sai J., Fan G.-H. y Richmond A. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; **16**:637-58.
129. Neves S.R., Ram P.T. y Iyengar R. G protein pathways. *Science* 2002; **296**:1636-9.
130. Nombela-Arrieta C., Lacalle R.A., Montoya M.C., Kunisaki Y., Megías D., Marqués M., *et al.* Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase γ during T and B lymphocyte homing. *Immunity* 2004; **21**:429-41.
131. Nombela-Arrieta C., Mempel T.R., Soriano S.F., Mazo I., Wymann M.P., Hirsch E., *et al.* A central role for DOCK2 during interstitial lymphocyte motility and sphingosine-1-phosphate-mediated egress. *J Exp Med* 2007; **204**:497-510.
132. IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine* 2003; **21**:48-9.
133. Ohl L., Bernhardt G., Pabst O. y Förster R. Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs. *Semin Immunol* 2003; **2003**:249-55.
134. Okada T., Ngo V.N., Ekland E.H., Forster R., Lipp M., Littman D.R., *et al.* Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med* 2002; **196**:65-75.

135. Okada T. y Cyster J.G. CC Chemokine Receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. *J Immunol* 2007; **178**:2973-78.
136. Okkenhaug K. y Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:317-30.
137. Ono S.J., Nakamura T., Miyazaki D., Ohbayashi M., Dawson M. y Toda M. Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol* 2003; **111**:1185-99.
138. Ottoson N.C., Pribila J.T., Chan A.S.H. y Shimizu Y. Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase. *J Immunol* 2001; **167**:1857-61.
139. Pachynski R.K., Wu S.W., Gunn M.D. y Erle D.J. Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) stimulates integrin $\alpha 4\beta 7$ -mediated adhesion of lymphocytes to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) under flow. *J Immunol* 1998; **161**:952-6.
140. Paoletti S., Petkovic V., Sebastiani S., Danelon M.G., Uguccioni M. y Gerber B.O. A rich chemokine environment strongly enhances leukocyte migration and activities. *Blood* 2005; **105**:3405-12.
141. Pierce K.L., Premont R.T. y Lefkowitz R.J. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**:639-50.
142. Procko E. y McColl S.R. Leukocytes on the move with phosphoinositide 3-kinase and its downstream effectors. *Bioessays* 2005; **27**:153-63.
143. Proudfoot A.E.I. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**:106-15.
144. Proudfoot A.E.I., Handel T.M., Johnson Z., Lau E.K., LiWang P., Clark-Lewis I., *et al.* Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**:1885-90.
145. Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A.D., Levy R.N. y Pasternack B.S. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; **46**:219-34.
146. Redondo-Muñoz J., Escobar-Díaz E., Samaniego R., Terol M.J., García-Marco J.A. y García-Pardo A. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by $\alpha 1\beta 1$ integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* 2006; **108**:3143-51.
147. Redondo-Muñoz J., Terol M.J., García-Marco J.A. y García-Pardo A. MMP-9 is upregulated by CCL21/CCR7 interaction via ERK1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-CLL cell invasion and migration. *Blood*. Prepublicado en Septiembre, 2007, como DOI 10.1182/blood-2007-08-107300.
148. Reif K. y Cantrell D.A. Networking Rho family GTPases in lymphocytes. *Immunity* 1998; **8**:395-401.

149. Reif K. y Cyster J. The CDM protein DOCK2 in lymphocyte migration. *Trends Cell Biol* 2002; **12**:368-73.
150. Reif K., Ekland E.H., Ohl L., Nakano H., Lipp M., Forster R., *et al.* Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 2002; **416**:94-9.
151. Reif K., Okkenhaug K., Sasaki T., Penninger J.M., Vanhaesebroeck B. y Cyster J.G. Cutting edge: Differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110 γ and p110 δ , in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol* 2004; **173**:2236-40.
152. Richardson S.J., Matthews C., Catherwood M.A., Alexander H.D., Carey B.S., Farrugia J., *et al.* ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Blood* 2006; **107**:3584-92.
153. Riento K. y Ridley A.J. ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**:446-56.
154. Ringshausen I., Schneller F., Bogner C., Hipp S., Duyster J., Peschel C., *et al.* Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase C- δ . *Blood* 2002; **100**:3741-8.
155. Ringshausen I., Dechow T., Schneller F., Weick K., Oelsner M., Peschel C., *et al.* Constitutive activation of the MAPkinase p38 is critical for MMP-9 production and survival of B-CLL cells on bone marrow stromal cells. *Leukemia* 2004; **18**:1964-70.
156. Riol-Blanco N., Sanchez-Sanchez N., Torres A., Tejedor A., Narumiya S., Corbi A.L., *et al.* The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol* 2005; **174**:4070-80.
157. Rollins B.J. Chemokines. *Blood* 1997; **90**:909-28.
158. Rosenkilde M.M., McLean K.A., Holst P.J. y Schwartz T.W. The CXC chemokine receptor encoded by Herpesvirus saimiri, ECRF3, shows ligand-regulated signaling through Gi, Gq, and G12/13 proteins but constitutive signaling only through Gi and G12/13 proteins. *J Biol Chem* 2004; **279**:32524-33.
159. Rumsey L.M., Teague R.M., Benedict S.H. y Chan M.A. MIP-1 α induces activation of phosphatidylinositol-3 kinase that associates with Pyk-2 and is necessary for B-cell migration. *Exp Cell Res* 2001; **268**:77-83.
160. Salcedo I., Campos-Caro A., Sampalo A., Reales E. y Brieva J.A. Persistent polyclonal B lymphocytosis: an expansion of cells showing IgVH gene mutations and phenotypic features of normal lymphocytes from the CD27⁺ marginal zone B-cell compartment. *Br J Haematol* 2002; **116**:662-6.
161. Sallusto F., Lenig D., Forster R., Lipp M. y Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; **401**:708-12.
162. Sánchez-Sánchez N., Riol-Blanco N., de la Rosa G., Puig-Kröger A., García-Bordas J., Martín D., *et al.* Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood* 2004; **104**:619-25.

163. Sánchez-Sánchez N., Riol-Blanco N. y Rodríguez-Fernández J.L. The Multiple Personalities of the Chemokine Receptor CCR7 in Dendritic Cells. *J Immunol* 2006; **176**:5153-9.
164. Sasaki T., Irie-Sasaki J., Jones R.G., Oliveira-dos-Santos A.J., Stanford W.L., Bolon B., *et al.* Function of PI3K γ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 2000; **287**:1040-6.
165. Sato S., Fujita N. y Tsuruo T. Involvement of 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1 in the MEK/MAPK Signal Transduction Pathway. *J Biol Chem* 2004; **279**:33759-67.
166. Scandella E., Men Y., Legler D.F., Gillesen S., Prikler L., Ludewig B., *et al.* CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood* 2004; **103**:1595-601.
167. Schimanski C.C., Schwald S., Simiantonaki N., Jayasinghe C., Gonner U., Wilsberg V., *et al.* Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:1743-50.
168. Schweickart V.L., Raport C.J., Godiska R., Byers M.G., Eddy R.L., Jr., Shows T.B., *et al.* Cloning of human and mouse EBI1, a lymphoid-specific G-protein-coupled receptor encoded on human chromosome 17q12-q21.2. *Genomics* 1994; **23**:643-50.
169. Sehgal A., Keener C., Boynton A.L., Warrick J. y Murphy G.P. CXCR4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J Surg Oncol* 1998; **69**:99-104.
170. Shimonaka M., Katagiri K., Nakayama T., Fujita N., Tsuruo T., Yoshie O., *et al.* Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J Cell Biol* 2003; **161**:417-27.
171. Smit M.J., Verdijk P., van der Raaij-Helmer E.M., Navis M., Hensbergen P.J., Leurs R., *et al.* CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood* 2003; **102**:1959-65.
172. Soma L.A., Craig F.E. y Swerdlow S.H. The proliferation center microenvironment and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Hum Pathol* 2006; **37**:152-9.
173. Song G., Ouyang G. y Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005; **9**:59-71.
174. Sotsios Y., Whittaker G.C., Westwick J. y Ward S.G. The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol* 1999; **163**:5954-63.
175. Springer T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; **76**:301-14.

176. Stein J.V., Soriano S.F., M'Rini C., Nombela-Arrieta C., de Buitrago G.G., Rodriguez-Frade J.M., *et al.* CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* 2003; **101**:38-44.
177. Stein J.V. y Nombela-Arrieta C. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* 2005; **116**:1-12.
178. Stephens L., Ellson C. y Hawkins P. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 2002; **14**:203-13.
179. Stephens L.R., Eguinoa A., Erdjument-Bromage H., Lui M., Cooke F., Coadwell J., *et al.* The G $\beta\gamma$ sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 1997; **89**:105-14.
180. Suire S., Coadwell J., Ferguson G.J., Davidson K., Hawkins P. y Stephens L. p84, a new G $\beta\gamma$ -activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110 γ . *Curr Biol* 2005; **15**:566-70.
181. Sullivan S.K., McGrath D.A., Liao F., Boehme S.A., Farber J.M. y Bacon K.B. MIP-3 α induces human eosinophil migration and activation of the mitogen-activated protein kinases (p42/p44 MAPK). *J Leukoc Biol* 1999; **66**:674-82.
182. Sumen C., Mempel T.R., Mazo I.B. y Von Andrian U.H. Intravital microscopy: visualizing immunity in context. *Immunity* 2004; **21**:315-29.
183. Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 2003; **105**:186-9.
184. Takeda H., Matozaki T., Takada T., Noguchi T., Yamao T., Tsuda M., *et al.* PI 3-kinase γ and protein kinase C- ζ mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor. *EMBO J* 1999; **18**:386-95.
185. Tamás P., Solti Z., Bauer P., Illés A., Sipéki S., Bauer A., *et al.* Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2 a guanine nucleotide exchange factor for Rac. *J Biol Chem* 2003; **278**:5163-71.
186. Tangemann K., Gunn M.D., Giblin P. y Rosen S.D. A high endothelial cell-derived chemokine induces rapid, efficient, and subset-selective arrest of rolling T lymphocytes on a reconstituted endothelial substrate. *J Immunol* 1998; **161**:6330-7.
187. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001; **2**:129-34.
188. Ticchioni M., Charvet C., Noraz N., Lamy L., Steinberg M., Bernard A., *et al.* Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* 2002; **99**:3111-8.
189. Ticchioni M., Essafi M., Jeandel P.Y., Davi F., Cassuto J.P., Deckert M., *et al.* Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene* 2007; **26**:7081-91.

190. Till K.J., Lin K., Zuzel M. y Cawley J.C. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* 2002; **99**:2977-84.
191. Todeschini G., Tecchio C., Meneghini V., Pizzolo G., Veneri D., Zanotti R., *et al.* Estimated 6-year event-free survival of 55% in 60 consecutive adult acute lymphoblastic leukemia patients treated with an intensive phase II protocol based on high induction dose of daunorubicin. *Leukemia* 1998; **12**:144-9.
192. Trentin L., Agostini C., Facco M., Piazza F., Perin A., Siviero M., *et al.* The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *J Clin Invest* 1999; **104**:115-21.
193. Turner L., Ward S.G. y Westwick J. RANTES-activated human T lymphocytes. A role for phosphoinositide 3-kinase. *J Immunol* 1995; **155**:2437-44.
194. Turner S.J., Domin J., Waterfield M.D., Ward S.G. y Westwick J. The CC chemokine monocyte chemoattractant peptide-1 activates both the class I p85/p110 phosphatidylinositol 3-kinase and the class II PI3K-C2alpha. *J Biol Chem* 1998; **273**:25987-95.
195. Vicente-Manzanares M., Rey M., Jones D.R., Sancho D., Mellado M., Rodríguez-Frade J.M., *et al.* Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *J Immunol* 1999; **163**:4001-12.
196. Vicente-Manzanares M., Cabrero J.R., Rey M., Pérez-Martínez M., Ursa A., Itoh K., *et al.* A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1 α -induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis. *J Immunol* 2002; **168**:400-10.
197. Vicente-Manzanares M. y Sánchez-Madrid F. Role of cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**:110-22.
198. Vivanco I. y Sawyers C.L. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:489-501.
199. Vlahakis S.R., Villasis-Keever A., Gomez T., Vanegas M., Vlahakis N. y Paya C.V. G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. *J Immunol* 2002; **169**:5546-54.
200. Voigt P., Dorner M.B. y Schaefer M. Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase γ that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J Biol Chem* 2006; **281**:9977-86.
201. Von Andrian U.H. y Mempel T.R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:867-78.
202. Wain J.H., Kirby J.A. y Ali S. Leucocyte chemotaxis: examination of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase activation by monocyte chemoattractant proteins-1, -2, -3 and -4. *Clin Exp Immunol* 2002; **127**:436-44.

203. Wang J., Xi L., Hunt J.L., Gooding W., Whiteside T.L., Chen Z., *et al.* Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. *Cancer Res* 2004; **64**:1861-66.
204. Ward S.G. Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation? *Trends Immunol* 2004; **25**:67-74.
205. Ward S.G. T lymphocytes on the move: chemokines, PI 3-kinase and beyond. *Trends Immunol* 2006; **27**:80-7.
206. Warnock R.A., Askari S., Butcher E.C. y Von Andrian U.H. Molecular mechanisms of lymphocytes homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 1998; **187**:205-16.
207. Weiss-Haljiti C., Pasquali C., Ji H., Gillieron C., Chabert C., Curchod M.L., *et al.* Involvement of phosphoinositide 3-kinase γ , Rac, and PAK signaling in chemokine-induced macrophage migration. *J Biol Chem* 2004; **279**:43273-84.
208. Wells C.T., Power C.A., Shaw J.P. y Proudfoot E.A. Chemokine blockers - therapeutics in the making? *Trends Pharmacol Sci* 2006; **27**:41-7.
209. Weston C.R. y Davis R.J. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2007; **19**:142-9.
210. Wetzler M., Dodge R.K., Mrózek K., Carroll A.J., Trantravahi R., Block A.W., *et al.* Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: the cancer and leukemia group B experience. *Blood* 1999; **93**:3983-93.
211. Wiestner A., Rosenwald A., Barry T.S., Wright G., Davis E., Henrickson S.E., *et al.* ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; **101**:4944-51.
212. Wiley H.E., Gonzalez E.B., Maki W., Wu M.T. y Hwang S.T. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93**:1638-43.
213. Willimann K., Legler D.F., Loetscher M., Roos R.S., Delgado M.B., Clark-Lewis I., *et al.* The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol* 1998; **28**:2025-34.
214. Wymann M.P., Zvelebil M. y Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase signalling - which way to target? *Trends Pharmacol Sci* 2003; **24**:366-76.
215. Yanagawa Y. y Onoe K. CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells. *Blood* 2002; **100**:1948-56.
216. Yang M., Sang H., Rahman A., Wu D.M., Malik A.B. y Ye R.D. G α 16 couples chemoattractant receptors to NF- κ B activation. *J Immunol* 2001; **166**:6885-92.
217. Yoshida R., Imai T., Hieshima K., Kusuda J., Baba M., Kitaura M., *et al.* Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J Biol Chem* 1997; **272**:13803-9.

218. Yoshida R., Nagira M., Kitaura M., Imagawa N., Imai T. y Yoshie O. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* 1998; **273**:7118-22.
219. Zlotnik A. y Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; **12**:121-7.
220. Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol* 2004; **14**:181-5.

